

RÉPUBLIQUE ALGERIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
ÉCOLE NATIONALE SUPÉRIEURE POLYTECHNIQUE



DÉPARTEMENT DE GÉNIE DE L'ENVIRONNEMENT
Laboratoire de Sciences et Techniques de l'Environnement

Mémoire de Magister

Présenté par:
M^{lle} BELOUHRANI Rachida

Pour l'obtention du titre de Magister en Génie de l'Environnement
Option: Génie de l'Environnement

Traitement biologique d'un sol contaminé par les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

Dirigé par :
M^{lle} J. Arrar Maître de conférences (ENSP)

Devant le jury:

Présidente : M^{me} A. Hellal Professeur (ENSP)
Examineurs : M^{me} D. Harik Professeur (ENSP)
M^r H. Lounici Professeur (UMMTO)
M^r A. Namane Maître de conférences (ENSP)

Année universitaire 2007-2008

ENP, 10, Avenue Hassen Badi, El-Harrach, Alger

Mes louanges à **ALLAH** le tout puissant qui m'a aidée et qui m'a donné le courage, la force et la volonté pour réaliser ce modeste travail.

REMERCIEMENTS

Le présent travail a été réalisé au sein du Laboratoire des Sciences et Techniques de l'Environnement du département de Génie de l'Environnement de L'École Nationale Polytechnique (ENSP).

La partie analyse par HPLC a été réalisée au laboratoire «explosifs et incendies» de la police scientifique. Que madame Z. *Bettache* reçoive ma profonde reconnaissance et mes chaleureux remerciements pour son aide et son soutien moral, et trois ans de patience.

Je tiens tout d'abord à remercier Mademoiselle J. *Arrar*, Maître de conférences à l'ENSP, pour m'avoir suivie et dirigée tout le long de ce travail et pour l'ensemble des connaissances qu'elle m'a transmis.

Je remercie Madame A. *Hellal*, Professeur à L'ENSP, pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant de présider le jury de ma soutenance.

Mes remerciements sont adressés à Madame D. *Harik*, Professeur à L'ENSP, à Monsieur H. *Lounici*, Professeur à l'université Mouloud Mammeri et à Monsieur A. *Namane*, Maître de conférences à L'ENSP, pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Mes sincères remerciements vont à Monsieur *Lounici*, à Monsieur *Namane*, à Monsieur *Kerbachi* à Monsieur Ahmed Zaid et à Madame *Abdi* ainsi qu'à Madame *Hellal* pour avoir mis à ma disposition leur savoir et pour m'avoir fait profiter de leurs connaissances et de leurs expériences dans le domaine.

Mes plus vifs remerciements sont adressés à l'ensemble du personnel et de techniciens des laboratoires du département pédologie de l'INA, en particulier Monsieur *Redwane* (technicien de laboratoire) et Mademoiselle *Fatma* (responsable de la bibliothèque).

Je voudrai également remercier Messieurs *Sebbih* et *Ghermouche*, professeurs à l'USTHB, Monsieur *Saada* du département de génie minier de l'ENSP et Madame *Debiche* du département génie civil de l'ENSP pour leur aide.

Enfin, je remercie tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin dans l'élaboration de ce mémoire, dont je suis honorée de dire qu'il est le fruit de multiples soutiens apportés par toutes les équipes du laboratoire des Sciences et Techniques de l'Environnement et du laboratoire des Biotechnologies Environnementales & Génie des Procédés.

Liste des abréviations

HAP	Hydrocarbure Aromatique Polycyclique
C ₆ H ₆	Benzène
K _{ow}	Coefficient de partage octanol/eau
COV	Composé Organique Volatil
PCB	PlyChlorure Biphényle
CO ₂	Dioxyde de Carbone
O ₃	Ozone
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
MO	Matière Organique
NaOH	Hydroxyde de sodium ou la soude
HCl	Chlorure d'hydrogène ou Acide chlorhydrique
HPLC	Chromatographie Liquide Haute Performance
DAD	Détecteur barrette de Diodes
U _f	Vitesse de fluidisation
U _j	Vitesse de jet
U _{mf}	Vitesse minimale de fluidisation
U _{mj}	Vitesse minimale de jet
d _h	Diamètre harmonique
C/N/P	Rapport Carbone/Azote/Phosphore
NH ₄ NO ₃	Nitrate d'amonium
KH ₂ PO ₄	Dihydrophosphate de potassium
W*	Humidité réduite
C ₀	Concentration à t ₀ , après 15 jours d'incubation et avant traitement
R _{bio}	Rendement de biodégradation des HAP
Q _c	Quantité du carbonedégagé et piégé sous forme de CO ₂
D _t	Pourcentage de minéralisation des HAP totaux

Liste des tableaux

Tableau I.1	Propriétés physico-chimiques des HAP
Tableau I.2	Demi-vies des HAP par biodégradation dans le sol
Tableau II.1	Propriétés des HAP étudiés
Tableau III.1	Caractéristiques du sol à étudier
Tableau III.2	Concentrations moyennes des HAP extraits par soxhlet et ultrason après 15 jours d'incubation (sol stérile)
Tableau III.3	Concentrations et rendements de biodégradation des HAP étudiés après 15 jours d'adaptation
Tableau III.4	Rendements instantanés de biodégradation des HAP, pour différents états du lit
Tableau III.5	Rendements globaux de biodégradation des HAP
Tableau III.6	Constantes de minéralisation des HAP
Tableau III.7	Résultats de l'étude respirométrique à la fin du traitement

Liste des figures

Figure I.1	Formule du benzène
Figure I.2	Formules du naphthalène et de l'anthracène
Figure I.3	Comportement des composés xénobiotiques dans l'environnement
Figure I.4	Voie bactérienne de dégradation du naphthalène
Figure I.5	Mécanisme d'attaque d'un HAP par une dioxygénase cas du naphthalène
Figure I.6	Voies bactériennes de dégradation du phénanthrène
Figure II.1	Montage expérimental
Figure III.1	Evolution de l'humidité réduite en fonction du temps
Figure III.2	Evolution de la vitesse de séchage en fonction du temps
Figure III.3 (a)	Evolution de la concentration du naphthalène en fonction du temps, influence de la vitesse d'aération sur sa dégradation abiotique
Figure III.3 (b)	Evolution de la concentration de l'acénaphthène en fonction du temps, influence de la vitesse d'aération sur sa dégradation abiotique
Figure III.3 (c)	Evolution de la concentration du phénanthrène en fonction du temps, influence de la vitesse d'aération sur sa dégradation abiotique
Figure III.4 (a, b)	Rendement d'élimination abiotique des HAP, pour différents états du lit
Figures III.5	Comparaison entre le comportement des trois HAP (sol stérile)
Figure III.6	Formules des HAP étudiés
Figure III.7	Evolution de la concentration du naphthalène en fonction du temps, pour différents états du lit
Figure III.8	Evolution de la concentration de l'acénaphthène en fonction du temps, pour différents états du lit
Figure III.9	Evolution de la concentration du phénanthrène en fonction du temps

- Figure III.10** Rendement de biodégradation des HAP, après 20 heures de traitement, pour différents états du lit
- Figure III.11** Rendement de biodégradation des HAP totaux pour différents états du lit
- Figures III. 12** Evolution de la quantité de carbone (sous forme de CO₂) en fonction du temps : influence de l'aération
- Figures III. 13** Evolution du taux de biodégradation des HAP totaux (déterminé par respirometrie) en fonction du temps :
influence de l'aération
- Figure III. 14** Evolution de la concentration relative du phosphore en fonction du temps (sol stérile et non stérile)

SOMMAIRE

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
Chapitre I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	2
I.1 Les Hydrocarbures Arômatiques Polycycliques (HAP).....	2
I.1.1 Définitions.....	2
I.1.2 Propriétés physico-chimiques des HAP.....	3
I.1.2.1 Solubilité.....	4
I.1.2.2 Coefficient de partage octanol/eau (K_{ow}).....	4
I.1.3 Toxicité des HAP.....	4
I.1.4 Génotoxicité des HAP.....	5
I.1.5 Origines des HAP.....	5
I.2 Pollution des sols par les HAP.....	6
I.2.1 Le sol.....	6
I.2.2 Types de pollution du sol.....	6
I.2.3 Risques environnementaux.....	6
I.2.4 Devenir des HAP dans l'environnement et le sol.....	7
I.3 Techniques de réhabilitation des sols pollués par les HAP.....	8
I.3.1 Choix et classification des méthodes de dépollution.....	8
I.3.2 Méthodes physiques.....	8
I.3.2.1 Méthodes physiques par piégeage.....	9
I.3.2.2 Méthodes physiques par évacuation.....	9
I.3.3 Méthodes thermiques.....	10
I.3.4 Traitements chimiques.....	10
I.3.4.1 La mobilisation et l'extraction.....	10
I.3.4.2 Les réactions chimiques.....	11
I.3.5 Méthodes biologiques.....	11
I.3.5.1 Biodégradation par traitement <i>in situ</i>	11
I.3.5.2 Traitement en réacteur ou Bioslurry.....	12
I.3.5.3 Biotertre et Landfarming.....	12
I.3.5.4 La phytoremédiation.....	13
I.4 Traitement biologique des sols pollués par les HAP.....	13
I.4.1 Généralités.....	14
I.4.1.1 Microflore des sols.....	14
I.4.1.2. Micro-organismes et polluants.....	14
I.4.1.3. Biodégradation des substances organiques.....	15
I.4.2 Biodégradation des HAP.....	16
I.4.3 Voies métaboliques de dégradation des HAP.....	17
I.4.3.1 Voies bactériennes.....	17
I.4.3.2 Voies fongiques.....	17
I.4.4 Caractéristiques d'un procédé de bioremédiation.....	20
I.4.4.1 Teneur en oxygène.....	20
I.4.4.2 Humidité du sol.....	21
I.4.4.3 pH du sol.....	21
I.4.4.4 Température.....	21
I.4.4.5 Biodisponibilité des polluants.....	22

Chapitre II : MATERIEL ET METHODES..... 23

II.1 Montage expérimental.....	23
II.2 Caractérisation du sol.....	25
II.2.1 Caractérisation physico-chimique.....	25
II.2.1.1 Granulométrie.....	25
II.2.1.2 Perméabilité.....	25
II.2.1.3 pH en solution aqueuse pH_{eau}	26
II.2.1.4 Teneur en humidité.....	26
II.2.1.5 Le phosphore.....	26
II.2.1.6 L'azote total.....	26
II.2.2 Analyse bactériologique du sol.....	26
II.3 Mesure du gaz carbonique par la méthode respirométrique.....	27
II.4 Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) étudiés.....	28
II.5 Extraction des HAP du sol.....	28
II.5.1 Prétraitement de l'échantillon du sol.....	28
II.5.2 Méthodes d'Extraction des HAP.....	29
II.5.2.1 Extraction par soxhlet.....	29
II.5.2.2 Extraction par ultrason.....	29
II.6 Dosage des HAP.....	30

Chapitre III : RESULTATS ET DISCUSSIONS..... 32

III.1 Etude du sol.....	32
III.1.1 Localisation.....	32
III.1.2 Caractéristiques physicochimiques du sol.....	33
III.1.3 Analyse bactériologique.....	34
III.1.4 Contamination du sol.....	34
III.2 Essais préliminaires de l'évolution de la teneur en humidité dans le lit.....	34
III.3 Efficacité de la méthode d'extraction des HAP.....	36
III.4 Traitement biologique d'un sol contaminé par les HAP.....	38
III.4.1 Dégradation abiotique des HAP dans le sol.....	39
III.4.2 Biodégradation des HAP.....	44
III.4.3 Biodégradation des HAP totaux.....	50
III.5 Etude de la respirometrie.....	51
III.6 Evolution de la teneur en phosphore.....	54

CONCLUSIONS 56

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... 58

ANNEXES..... 66

- A1 : Etalonnage du débit mètre, calcul des vitesses de l'air
- A2 : Distribution granulométrique : diamètres des particules
- A3 : Courbe d'étalonnage du phosphore assimilable
- A4 : Dosage de l'azote total
- A5 : Les seize HAP identifiés comme polluants prioritaire par l'EPA
- A6 : Extracteur soxhlet et ultrason
- A7 : Droites d'étalonnage des trois HAP étudiés
- A8 : Détermination des vitesses minimales de fluidisation et de jet

INTRODUCTION

GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), molécules organiques constituées de cycles aromatiques condensés, sont produits en quantités importantes en particulier dans les processus de pyrolyse et de combustion mis en œuvre dans l'industrie, les transports et les chauffages.

De nombreuses études ont mis en évidence le caractère cancérigène et/ou mutagène des HAP qui présentent un risque toxicologique important, même aux faibles concentrations (**Bliefert et Perraud**, 2004). En outre, ces composés sont peu biodégradables, ce qui les rend persistants dans le sol. Ainsi leur sort dans l'environnement est devenu un sujet préoccupant (**Lecoz *et al***, 1996).

De nombreuses études ont montré que les sols constituaient le principal point de fuite environnementale des HAP (**Pansu *et al***, 1998).

Par ailleurs, un problème important est actuellement posé au sujet de la protection de l'environnement, celui des sites industriels pollués par les HAP et de leur réhabilitation notamment au niveau de leur impact sur les aquifères et la ressource en eau.

Il est alors devenu important de connaître la biodégradabilité de ces xénobiotiques, dans les différentes situations aérobiques envisageables. Une telle connaissance est également nécessaire pour évaluer les possibilités de réhabilitation, par dégradation microbologique, de ces sols pollués.

Les techniques de remédiation des sols reposent sur des processus physico-chimiques et/ou biologiques. A l'heure actuelle, la principale méthode de décontamination consiste à faire confiance aux microorganismes présents naturellement dans le sol pour dégrader les HAP (**Costes et Duelle**, 1997 ; **Colin**, 2000).

Ainsi le procédé de bioremédiation du sol est basé sur la capacité qu'ont ces microorganismes à utiliser les polluants organiques comme substrat. Ce processus de biodégradation naturelle est généralement accéléré en procurant aux bactéries un environnement favorable pour leur développement. C'est dans cette optique que ce travail de magister a été mené. En effet, nous avons choisi d'étudier le traitement biologique d'un sol contaminé par les HAP dans un réacteur fluidisé à jet.

Le présent mémoire se subdivise en trois parties. La première est une analyse de littérature scientifique où sont exposées les données relatives aux HAP (sources, toxicité, normes...), suivies de l'étude de leur devenir dans les sols (sorption, dégradation...). Enfin notre attention se portera sur les procédés de bioremédiation après avoir défini les différentes techniques de réhabilitation utilisées.

Dans la seconde partie, les matériels et méthodes ainsi que les caractéristiques des appareillages et des produits utilisés seront présentés. Les protocoles expérimentaux seront également détaillés.

La troisième partie est consacrée à la présentation et la discussion des résultats obtenus concernant :

- ✓ l'extraction des HAP par le méthode de soxhlet et d'ultrason,
- ✓ l'étude de l'élimination des HAP du sol dans un réacteur fluidisé à jet, en présence ou non des bactéries autochtones du sol traité. Différents taux d'oxygénation sont utilisés.

CHAPITRE I :

SYNTHESE

BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) sont des molécules organiques issues de la combustion incomplète de matières carbonées et qui présentent un risque toxicologique important (**Bliefert et Perraud, 2004**). Ces composés, constitués de cycles aromatiques condensés, sont produits par l'activité humaine, et notamment dans les processus de pyrolyse et de combustion mis en œuvre dans l'industrie, les transports et les chauffages.

De nombreuses études ont montré que les sols constituaient le principal point de fuite environnementale des HAP (**Pansu et al, 1998**). Du fait de leur caractère rémanent et toxique, l'agence américaine de protection de l'environnement (U.S. EPA) a répertorié seize HAP à éliminer des sols lorsqu'ils y sont détectés. Afin d'éliminer ou de limiter cette pollution, plusieurs procédés de traitement peuvent être préconisés.

Les techniques de remédiation des sols reposent sur des processus physico-chimiques ou biologiques (**Colin, 2000**).

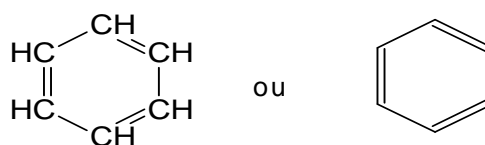
I.1 Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP)

I.1.1 Définitions

Les hydrocarbures sont des molécules qui ne contiennent que du carbone et de l'hydrogène (**Wauguier, 1994**). Le terme « aromatique » sert à déduire la classe des composés qui comportent des cycles de type benzénique (**Richards et al, 1984**).

Le plus simple hydrocarbure aromatique, benzène C_6H_6 (figure I.1), fut découvert par Faraday en 1825 dans le gaz d'éclairage. En 1845, Hofmann l'isola du goudron de houille (**Potapov et Tatarintchik, 1988**).

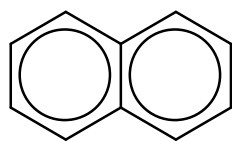
En 1865, Kekulé proposa une structure cyclique pour le benzène, quoiqu'il reconnaisse que la formule du cyclohexatriène-1, 3, 5 ne pouvait pas expliquer adéquatement les propriétés chimiques de ces hydrocarbures (**Richards et al, 1984**):



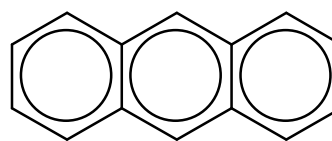
Benzène

Figure I.1 : Structure du benzène

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont constitués d'au moins deux cycles aromatiques (cycles de type benzène). Le naphthalène qui comporte deux cycles accolés et l'anthracène qui comprend trois cycles (figure I.2), sont deux des plus simples molécules aromatiques polycycliques (**Murry, 2000**).



Naphthalène (NAP)



Anthracène (ANT)

Figure I.2 : Structures du naphthalène et de l'anthracène**I.1.2 Propriétés physico-chimiques des HAP**

Les propriétés physico-chimiques des HAP présents dans l'environnement sont données dans le tableau I.1.

Tableau I.1 : Propriétés physico-chimiques des HAP (**Bouchez *et al.*, 1996**)

HAP	Propriétés	Masse Molaire (g.mol ⁻¹)	Point de fusion (°C)	Point d'ébullition (°C)	Solubilité dans l'eau (mg.L ⁻¹)	f _L /f _S ^(a)	log K _{ow} ^(b)	log K _{ow} ^(c)
Naphthalène		128,2	80	218	32	3,53	3,35	3,37
Acénaphtylène		152,2	82	270	3,93	4,61		4,07
Acénaphène		154,2	93	279	3,42	4,71	3,92	
Fluorène		166,2	116	294	1,9	7,94	4,18	4,18
Phénanthrène		178,2	100	338	1,0	5,65	4,52	4,46
Anthracène		178,2	216	340	0,07	77,5	5,54	4,45
Fluoranthène		202	107	383	0,27	7,09	5,22	5,33
Pyrène		202	150	393	0,16	19,8	5,18	5,32
Chrysène		228,2	254	441	0,006	189	5,79	5,61
Benzo(a)anthracène		228,2	156	435	0,0057	21,6		
Benzo(a)pyrène		252	179	496	0,0038	32,3	5,98	

(a) rapport à 25°C des fugacités d'un HAP entre l'état liquide en surfusion et l'état solide :

$$\frac{f_L}{f_S} = \exp \left[6,78 \left(1 - \frac{T_f}{T} \right) \right]$$

Où : T_f est le point de fusion du HAP et T la température du système

(b) K_{ow} coefficient de partition ou de partage K_{ow} d'un composé donné dans un système standard diphasique « octanol/eau »,

(c) le logarithme décimal du coefficient de partition selon **Mulder *et al.* (2001)**

Les HAP se subdivisent en deux groupes : les légers, dont la masse molaire est comprise entre 128 et 180 g.mol⁻¹ (HAP de moins de quatre cycles) et les lourds (au moins quatre cycles) ; dont les masses molaires varient de 200 à 280 g.mol⁻¹.

Les HAP ont un point de fusion supérieur ou égal à 80°C et un point d'ébullition élevé, compris entre 200°C et 500°C, ce sont des composés semi volatils.

I.1.2.1 Solubilité

La solubilité, exprimée en mol.L⁻¹ ou en mg.L⁻¹, correspond à la concentration du produit en phase aqueuse lorsque l'équilibre est atteint. La solubilité augmente avec la température et peut être un bon indicateur de la tendance d'un produit à être entraîné par les eaux du sol.

La solubilité des HAP est notable pour le naphthalène (32 mg.L⁻¹) mais décroît ensuite très rapidement avec l'augmentation du nombre de cycles aromatiques (160 µg.L⁻¹ pour le pyrène, 4 µg.L⁻¹ pour le benzo (a) pyrène). Il en va de même pour leur volatilité (**LCPE**, 1994; **Bouchez et al**, 1996).

La solubilité est également fonction de la fraction molaire de chaque composé dans le mélange de polluant, ainsi que de la teneur en matière organique MO de la phase particulaire (**Ballerini et al**, 1998).

I.1.2.2 Coefficient de partage octanol/eau (K_{ow})

Le coefficient de partage traduit la répartition d'une molécule d'un soluté entre la phase lipophile (octanol) et la phase hydrophile (eau). Ce coefficient donne une indication sur sa capacité à s'adsorber sur des surfaces hydrophobes. Par exemple, ce coefficient est un bon indicateur de la capacité des polluants à pénétrer les membranes biologiques qui sont des bicouches lipidiques, et donc à s'accumuler dans les organismes vivants. Pour les HAP, les logarithmes décimaux du coefficient de partage varient de 3,37 à 6,5 (**Mackay et al**, 1992).

Les K_{ow} sont relativement élevés, ce qui indique un fort potentiel d'adsorption sur les matières particulaires, mais aussi sur la matière organique des sols. Du fait de ces valeurs de K_{ow} élevées, les HAP pourront être extraits par des solvants organiques ou des tensioactifs (**Vogel et Ballerini**, 2001).

De plus, les HAP sont adsorbables sur divers supports solides et existent fréquemment sous cette forme dans l'environnement (**LCPE**, 1994).

Le naphthalène et les autres hydrocarbures aromatiques polycycliques présentent plusieurs propriétés liées à l'aromaticité. Ils réagissent ainsi avec des réactifs électrophiles comme le di-brome Br₂, pour conduire à des produits de substitution, plutôt qu'à des produits d'addition (**Murry**, 2000 ; **LCPE**, 1994).

I.1.3 Toxicité des HAP

Le principal risque que présentent les HAP sur la santé, est leur capacité à induire le développement de cancer dans les organismes exposés. Ce risque est certainement l'un des plus anciennement connus, depuis la description des cancers de la peau et du scrotum des ramoneurs de cheminées (**Costes et Druelle**, 1997).

Le benzo(a)pyrène est potentiellement le plus cancérigène (**Phillips et Boffetta**, 1994; **Valat**, 2005). D'autres HAPs sont également reconnus comme étant fortement génotoxiques et cancérigènes, comme le fluoranthène, le benzo(b)fluoranthène, le benzo(k)fluoranthène, le chrysène, le benzo(g,h,i)pérylène et l'indéno(1,2,3-cd)pyrène (**Feix et al.**, 1995).

Le naphthalène est peu toxique car, en général, l'ingestion d'une dose d'environ quatre grammes n'entraîne qu'une irritation des muqueuses et éventuellement quelques troubles neurobiologiques réversibles.

L'assimilation des HAP par l'homme se fait en général par:

- les voies respiratoires via l'inhalation de particules atmosphériques contaminées ou de fumées de cigarettes. Le taux d'absorption par les poumons dépend du type de HAP, de la taille et de la composition des particules sur lesquelles ils sont adsorbés ;
- le système digestif via l'ingestion de produits alimentaires contaminés, notamment les produits grillés ou fumés. Le poisson fumé peut contenir jusqu'à 80 µg d'HAPs par kilogramme ;
- la peau (**Boffeta et al, 1997; Wornat et al, 2001**).

Les personnes travaillant dans l'industrie du bois, dans des locaux confinés contenant des fourneaux ou utilisant du goudron ou de l'asphalte présentent un risque accru de cancer des poumons, de l'œsophage et de la peau (**Boffetta et al, 1997; Partanen et Boffetta, 1994; Wornat et al, 2001**).

I.1.4 Génotoxicité des HAP

L'étude de la génotoxicité des HAP a progressé à partir des années 1960 avec l'essor de la biochimie et de la biologie moléculaire, la reconnaissance de la similarité profonde des mécanismes de concérogénèse et de mutagénicité et le développement des tests de génotoxicité. Le test bactérien de mutagénicité est très utilisé pour déterminer le pouvoir mutagène (et potentiellement cancérogène) des produits chimiques (**Bouchez et al, 1996**).

Les HAP ne sont pas mutagènes en eux même, ils le deviennent chez l'organisme qui les a absorbés, par suite d'une oxydation enzymatique par une monooxygénase (enzyme qui appartient au groupe cytochrome P-450) présente dans les tissus animaux.

Le rôle du cytochrome P-450 est la détoxification des produits xénobiotiques ingérés qui sont ainsi convertis en dérivés hydrosolubles et donc éliminables. Dans le cas des HAP, le cytochrome P-450 effectue des réactions d'époxydation. Son action conduit à la formation de diolépoxydes, métabolites mutagènes et cancérogènes.

Les diolépoxydes se fixent, par des mécanismes complexes, sur l'ADN et entraînent des modifications du matériel génétique (mutation) qui sont à la base des processus de cancérogénèse (**Bouchez, 1995**).

I.1.5 Origines des HAP

Les HAP proviennent principalement des processus de pyrolyse et en particulier de la combustion incomplète de matière organique. Ils sont surtout d'origine anthropique mais ils peuvent aussi être présents dans l'environnement de façon naturelle par l'intermédiaire des feux de forêts ou des volcans par exemple (**Bouchez et al, 1996; Costes et Druelle, 1997**).

Toutefois, outre l'origine pyrolytique (qui est une source majoritaire), les HAP sont également introduits dans l'environnement par contamination par des produits pétroliers (raffinage, transport et pétrochimie notamment) (**Jeannot et al, 2001**).

I.2 Pollution des sols par les HAP

I.2.1 Le sol

Le sol est un milieu dynamique (vivant) et complexe, soumis à des influences climatiques différenciées et à des processus chimiques, physiques et biologiques (**Pansu *et al*, 1998; Bliefert et Perraud, 2004**). Il représente une interface entre les différents milieux et est un lieu de transfert de particules et de polluants vers les hydrosystèmes (**Lecoz *et al*, 1998**).

Les polluants organiques des sols proviennent principalement de trois ensembles d'activités : industrielles (production d'énergie, métallurgie, industrie chimique...), urbaines (transport, gestion et traitement des déchets), et agricoles (utilisation de produits phytosanitaires).

Mis à part les aliphatiques et les pesticides, d'autres polluants organiques sont largement rencontrés dans les sols : les composés organiques volatils (COV), les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et les polychlorobiphényles (PCB) (**Barriuso, 1996**).

I.2.2 Types de pollution du sol

En fonction du mode d'apports des polluants au sol et de l'étendue des pollutions, on distingue :

1) des pollutions ponctuelles ou accidentelles, se caractérisant par des déversements très localisés (pollution localisée), dans l'espace et dans le temps, d'un nombre limité de produits à des concentrations élevées.

2) des pollutions diffuses, impliquant des polluants à faibles concentrations sur de grandes surfaces, c'est le cas de la pollution des sols par les polychlorobiphényles (PCB) et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) provenant de dépôts atmosphériques ou des pollutions dues aux pesticides lors de leur usage agricole.

I.2.3 Risques environnementaux

Un sol pollué représente trois types de risques environnementaux:

- mise en contact direct des polluants avec l'occupant du sol (par exemple, jeux d'enfants sur un site pollué) ;

- lessivage des polluants par les eaux d'infiltration et transfert des polluants vers les eaux souterraines et superficielles (pollution possible des ressources en eaux) ;

- réintroduction des polluants dans la chaîne alimentaire par les végétaux et les organismes vivants du sol (**Riviere, 1998**).

I.2.4 Devenir des HAP dans l'environnement et le sol

Le devenir des HAP émis dans l'environnement, notamment leurs modes de transport et de dispersion, leur transformation et leur évolution ultime, est un élément essentiel d'évaluation de la pollution due à ces composés.

Deux modes de transport des HAP sont à envisager, par voie atmosphérique et par voie aqueuse (**Bouchez et al**, 1996).

En ce qui concerne les émissions atmosphériques, le transport des HAP s'effectue soit en phase gazeuse soit, en très grande partie, sous forme adsorbée à des particules.

Les retombées atmosphériques sèches ou humides de ces composés peuvent se situer à de très grandes distances de leur point d'émission, ce qui explique l'omniprésence des HAP dans l'environnement. Cependant, une bonne partie de ces émissions se déposent rapidement (**LCPE**, 1994; **Wilcke**, 2000).

En effet, **Wild et Jones** (1995) estiment que 90 % des HAP émis dans l'environnement sont stockés dans les sols, ce chiffre ne prenant pas en compte les sites contaminés suite à des activités industrielles (usines à gaz, raffineries de pétrole ou usines de traitement de bois). Dans ce cas, la pollution s'étend vers les horizons les plus profonds du sol.

Le transport par voie aqueuse, quand à lui, implique notamment le lessivage des sols par les eaux de ruissellement et concerne ainsi les retombées atmosphériques particulaires. Il concerne également les produits pétroliers directement répandus (sols, égouts).

Une fois déposés sur la couche superficielle du sol, les HAP sont susceptibles d'être affectés par certains phénomènes tels que la volatilisation, la migration, l'absorption par des plantes, l'adsorption à des particules de matière organique ou la dégradation microbologique (**Pichard**, 2002).

➤ La volatilisation ne semble avoir une influence que sur les HAP à deux et trois cycles (**Wild et al**, 1990).

➤ La migration des HAP de la couche superficielle vers les couches inférieures est un phénomène particulière minime dépendant des caractéristiques du sol et touchant de manière non sélective l'ensemble des HAP (**Jones et al**, 1989a).

➤ L'élimination des HAP, suite à une absorption par les plantes, est très faible. **Wild et al**. (1992) ont montré que quelques HAP de bas poids moléculaire (phénanthrène, fluorène) peuvent se retrouver dans les végétaux, après analyse de plantes poussées sur des champs amendés au préalable. Les HAP trouvés dans les parties aériennes proviennent de dépôts atmosphériques tandis que les HAP retrouvés dans les racines et les tubercules peuvent être absorbés à partir du sol.

➤ Différents auteurs ont noté que des concentrations élevées en HAP sont associées à des particules contenant des fortes teneurs en matières organiques (**Evans et al**, 1990b).

➤ La biodégradation semble être un des facteurs importants de l'évolution des HAP

De manière générale, on peut dire que le devenir des HAP est fonction de leurs caractéristiques physicochimiques (les HAP de haut poids moléculaire sont les plus résistants) mais également des caractéristiques intrinsèques du sol (pH, pourcentage en matière organiques) ainsi que de son historique (adaptation de microorganismes).

I.3 Techniques de réhabilitation des sols pollués par les HAP

I.3.1 Choix et classification des méthodes de dépollution

Les HAP présentent un risque pour la santé humaine et les écosystèmes si leur concentration et leur mobilité sont trop importantes. Pour éviter la diffusion des HAP des sites contaminés vers les profondeurs des sols, des mesures doivent être prises.

Beaucoup de paramètres sont à prendre en compte avant de faire le choix d'une méthode particulière de dépollution : type de polluant et variabilité de leur comportement (volatilité, adsorbabilité, polarité...), diversité des conditions locales (nature du sol, de la nappe, accessibilité, disponibilité de surfaces utilisables à proximité, zone urbaine ou non), pollution récente ou ancienne, étendue ou non. En plus, les exigences économiques et administratives sont à prendre en compte.

En fonction de ces différents aspects, trois grandes catégories d'actions peuvent être menées :

- ❖ Le confinement qui consiste à isoler la pollution à l'aide d'ouvrages étanches ;
- ❖ Les méthodes *ex situ* qui consistent en l'excavation des sols contaminés. On parlera de méthode "hors site" si le sol est évacué vers un centre de traitement spécialisé, ou de méthode "sur site" si le sol excavé est redéposé sur le site pour être traité ;
- ❖ Les méthodes *in situ* pour lesquelles l'opération de dépollution s'effectue sans excavation du sol. Cette option est souvent choisie pour traiter des sites en activité ou lorsque la zone polluée est trop étendue pour avoir recours à l'excavation (**Gabet, 2004**).

Selon **Lecomte (1995)**, il est préférable de baser la classification des différentes techniques et méthodes de dépollution sur la technologie elle-même, en distinguant quatre groupes de méthodes, réunissant chacun un ensemble de techniques différentes autour d'un même principe méthodologique pris au sens large.

On décrira ainsi :

1. Les méthodes physiques ;
2. Les méthodes chimiques ou électrochimiques ;
3. les méthodes thermiques ;
4. les méthodes biologiques ;

I.3.2 Méthodes physiques

Les méthodes physiques consistent à transférer et concentrer les polluants, sans les modifier ou les détruire, vers des points de récupération en se servant, pour leur transport, de fluides (eau ou gaz) injectés ou présents dans les sols.

I.3.2.1 Méthodes physiques par piégeage

L'objectif général commun à toutes les méthodes par piégeage, consiste à bloquer une pollution à l'endroit où elle s'est répandue dans le milieu naturel, et empêcher qu'elle ne s'étende davantage.

Dans ce groupe de techniques, on peut distinguer deux choix technologiques principaux (**Colin, 2000**): le confinement et la solidification-stabilisation.

- Le **confinement** consiste à isoler la source de pollution, à l'aide de matériaux argileux et/ou synthétiques, pour empêcher la migration des substances polluantes.

Cette technique est principalement utilisée pour les anciennes décharges ou les anciens sites industriels.

- La **solidification-stabilisation** s'applique principalement sur des sols excavés. Les polluants sont piégés dans une matrice constituée d'un mélange de sol et d'adjuvants cimentants ou polymérisants, formant ainsi un matériau composite solide, peu perméable et non réactif (**Colin, 2000**).

I.3.2.2 Méthodes physiques par évacuation

Les méthodes par évacuation sont nombreuses ; elles s'adressent aussi bien aux milieux contaminés solides (sols) que liquides (nappes phréatiques, eaux de surface) et concernent également des phases polluantes « pures ».

- L'**excavation** est la méthode la plus simple à mettre en œuvre et qui permet de supprimer rapidement une source de pollution locale (**Bliefert et Perraud, 2004**). Outre sa capacité d'exécution, elle offre aussi l'avantage d'être radicale. Elle présente cependant certains désavantages et difficultés de réalisation non négligeables:

- Problèmes de transport et de stockage des terres excavées (sur site, hors site suivant la place disponible) ;

- Risque d'extension de la pollution (**Colin, 2000**).

- Le **pompage de l'eau** permet de confiner hydrauliquement la pollution et de procéder à une décontamination en surface de l'eau pompée afin de pouvoir la réinjecter.

Les principaux intérêts de cette méthode sont une mise en œuvre assez rapide et une durée de traitement qui varie de 3 à 18 mois, dans des conditions optimales (**Colin, 2000**).

Cependant le risque de dissémination de la pollution peut être important si l'ouvrage est mal implanté et attire la pollution vers une zone non contaminée.

- Le **pompage-écrémage** est basé sur le pompage sélectif d'un produit flottant. Il s'applique donc pour des produits organiques en phase flottante au toit de la nappe, comme les hydrocarbures.

Cette méthode est généralement couplée à un rabattement de nappe qui facilite l'écoulement du toxique vers le point de captage. L'intérêt principal de cette méthode repose sur l'élimination rapide d'une grande quantité de polluant et, si le rabattement n'est pas trop fort, elle n'induit pas de pollution en profondeur supplémentaire.

Cette technique ne s'emploie pas seule et elle est toujours couplée à des méthodes permettant de traiter le polluant restant, qui représente en moyenne 50 % de la quantité initiale contenue dans le sol (**Colin, 2000**).

- **L'extraction des polluants gazeux**, appelée généralement « **Venting** », est une technique particulièrement efficace pour traiter les nombreux cas de contamination par les hydrocarbures légers de type essence. Elle est peu applicable aux HAP car ils sont peu volatils. C'est une technique appliquée *in situ*, qui peut traiter la partie non saturée du sol (au dessus de la nappe phréatique), mais qui peut également traiter la nappe phréatique – et qui prend alors le nom de « **Stripping** » ou « **Sparging** » (Lecomte, 1995).

I.3.3 Méthodes thermiques

Deux techniques *ex situ* sont utilisées, l'**incinération** et la **désorption thermique**, et sont employées pour la décontamination des sols pollués par les produits organiques. Ces technologies consistent à utiliser les hautes températures pour détruire les polluants en dioxyde de carbone (CO₂) et en eau (H₂O) (Lecomte, 1995).

- **L'incinération** : est la seule technique qui détruit réellement les polluants. Cependant cette technique est extrêmement coûteuse et les fumées toxiques qui se dégagent lors de la combustion nécessitent d'importants traitements qui engendrent des surcoûts (Bliefert et Perraud, 2004).

- La méthode la plus largement utilisée est celle du désorbeur ou four rotatif (Bliefert et Perraud, 2004 ; Colin, 2000 ; Lecomte, 1995) dans lequel le sol, débarrassé des fractions grossières, est porté à une température suffisamment élevée pour permettre la désorption de l'humidité et des contaminants. Ce procédé est bien adapté aux sols contaminés par des hydrocarbures.

- La **vitrification** consiste à transformer par élévation de température, un sol contaminé en un matériau fondu inerte. C'est donc une méthode thermique *in situ* se rapprochant de la stabilisation.

I.3.4 Traitements chimiques

Les traitements chimiques ont pour but de détruire les polluants ou de les transformer en une forme moins nocive pour l'environnement, en provoquant des réactions chimiques entre le polluant et le réactif ajouté.

Ils peuvent être applicables *in situ* ou après excavation des sols. La majorité des procédés exigent que les sols soient sous forme de boues ou que les contaminants soient mobilisés dans un milieu liquide (Bliefert et Perraud, 2004).

I.3.4.1 La mobilisation et l'extraction

Communément assimilée à un lessivage ou à un lavage, la mobilisation d'un polluant par une solution (ex : tensioactif) et son transfert à l'extérieur du milieu pollué représente une technique aux multiples aspects.

Elle concerne quasiment tous les contaminants, selon le type de produit mobilisateur utilisé dans la solution. La technique par lavage peut être envisagée *in situ* ou sur site (Lecomte, 1995).

I.3.4.2 Les réactions chimiques

Les réactions chimiques permettent de transformer les polluants en des composés moins toxiques et de mobilité différente. Ce type de traitement est habituellement appliqué sur site.

On peut distinguer trois types de réactions principales, l'oxydation, la réduction et la déchloration. Elles sont généralement réservées à des produits organiques peu volatils et difficilement biodégradables (**Lecomte**, 1995).

L'oxydation est la seule méthode applicable aux HAP car la réduction ne se fait que sur des produits halogénés. Les oxydants les plus utilisés pour traiter les HAP sont l'ozone (O_3) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (**Colin**, 2000). Ces réactions induisent un coût supplémentaire.

L'**ozone** sert à traiter les effluents liquides mais peut être utilisée *in situ* (**Colin**, 2000).

L'**eau oxygénée** est utilisée pour dégrader directement les composés organiques complexes et réfractaires à la biodégradation. Ce processus, bien qu'efficace, n'est pas spécifique (**Colin**, 2000).

I.3.5 Méthodes biologiques

Les traitements biologiques consistent à utiliser des organismes supérieurs (végétaux) ou des microorganismes pour dégrader les polluants organiques. Les champignons, les bactéries, les actinomycètes et les algues sont les principaux microorganismes du sol. En général, sous leur action, les polluants organiques sont transformés en molécules de moins en moins polluantes (en terme de persistance et de toxicité).

Les méthodes de dépollution biologique visent donc à augmenter les capacités de dégradation des microorganismes des sols pour accélérer les phénomènes naturels, afin de ramener les quantités de polluants extractables en dessous des normes établies.

On dispose (**Mougin et al**, 1996) de deux types de procédés, qui tous deux mettent en œuvre principalement des bactéries et des champignons : la biostimulation (stimulation de l'activité des microorganismes autochtones) et la bioaugmentation (introduction des microorganismes allochtones sélectionnés). Il font appel à trois types de technologies : biodégradation par traitement *in situ*, traitement en réacteur ou bioslurry, biotertre et landfarming.

I.3.5.1 Biodégradation par traitement *in situ*

Cette technique fait appel au pompage et injection de l'oxygène sous forme gazeuse (O_2 , O_3) ou liquide (H_2O_2) et injection de nutriments nécessaires à l'activité microbienne.

La source d'oxygène est le principal inconvénient de ce système, car l'injection d'eau saturée en air n'est pas suffisante. L'apport d'oxygène s'effectue de plus en plus en phase liquide surtout à partir de peroxyde d'hydrogène.

Cependant cette source d'oxygène présente trois inconvénients majeurs : son coût, le caractère corrosif de H_2O_2 , qui attaque les puits d'injection (**Colin**, 2000) et le pouvoir désinfectant de H_2O_2 si celui-ci est utilisé à de fortes concentrations.

I.3.5.2 Traitement en réacteur ou Bioslurry

Le principe consiste à réaliser et faciliter la biodégradation dans un contenant installé sur le site, en ajoutant au sol, les nutriments nécessaires aux micro-organismes.

Le sol est excavé et subit diverses opérations de broyage, tamisage et d'homogénéisation ; il est ensuite mélangé à de l'eau, généralement en proportions de 30 % en poids / volume et introduit dans le réacteur par pompage. Différents modes de fonctionnements sont possibles, en continu ou en discontinu.

La plupart des dispositifs sont constitués de plusieurs réacteurs en chaîne, ce qui permet de transférer la boue d'un réacteur à l'autre. Dans chaque réacteur, un brassage assure un contact et un transfert de masse maximum entre le polluant et les bactéries.

Les gaz produits sont traités à l'aide de filtres à charbon actif ou de biofiltres. Après séparation du solide et de l'eau, la terre recueillie est stockée puis remise sur site et l'eau contenant les micro-organismes est recyclée.

Cette technique s'adresse à des sols pollués par des substances peu biodégradables, type HAP, et pour des sols généralement difficiles à traiter comme les sols argileux (**Bliefert et Perraud, 2004**).

Les principaux atouts de cette technique sont sa facilité à contrôler et à maintenir les conditions optimales de traitement ; les durées de mises en oeuvre sont plus courtes et n'excèdent généralement pas 6 à 9 mois ; enfin la structure du sol n'est pas trop altérée et sa réutilisation est envisageable pour des usages de reconstruction paysagère.

Le principal inconvénient est le coût de la méthode par rapport aux autres techniques biologiques et une efficacité moindre pour des HAP de masse élevée. Un deuxième inconvénient à l'utilisation de cette technique peut être la toxicité des sous-produits formés au cours du processus de bioremédiation (**Bliefert et Perraud, 2004**).

I.3.5.3 Bioterre et Landfarming

Le bioterre et le landfarming regroupent toutes les applications qui mettent en oeuvre des tas de terre contaminées de différentes hauteurs allant de quelques dizaines de centimètres jusqu'à quelques mètres, y compris ceux qui ont été additionnés de matières végétales (composts).

Pour cela, le sol est étalé après excavation sur une grande surface imperméable, sur une épaisseur de quelques dizaines de centimètres et la terre est ensuite retournée avec d'éventuels ajouts favorisant la biodégradation (**Mougin et al, 1996**).

La durée de traitement est de 12 à 24 mois pour les HAP, pour un taux moyen d'élimination de 80 % (le rendement varie selon la molécule). Lorsque le taux n'est pas suffisamment élevé, de la biostimulation peut être effectuée par ajout de nutriments spécifiques, ou bioaugmenté par ajout de bactéries adaptées à la pollution.

Straube et al (2003) ont constaté une réelle amélioration des taux de dégradation des HAP après avoir ajouté de l'azote (augmentation de 10 % du taux de biodégradation).

De même, **Juhasz et Naidu** (2000) révèlent que la bioaugmentation est une solution pour favoriser la dégradation des HAP lourds (benzo[a]pyrène) ou le traitement des sols fortement contaminés.

Pour des sols pollués contenant des contaminants volatils en quantités non négligeables, ou dans des pays où la législation interdit le traitement de dépollution à l'air libre (Québec par exemple), l'utilisation de la "**biopile**" est nécessaire. Les réacteurs à l'air libre sont alors remplacés par des réacteurs où les flux de gaz et de liquide sont parfaitement contrôlés. On réalise une pile de plusieurs mètres de haut que l'on place sur une couche drainante. Un système d'aspersion et un système de rigole sont mis en place.

Pour les gaz, le procédé utilise le plus souvent un système de ventilation/extraction qui permet d'aspirer les composés émis ou d'injecter de l'air frais. Une couverture étanche (géomembrane) vient recouvrir l'ensemble. Cette technique est utilisée pour traiter les HAP. **Lecomte** (1995) indique qu'après 9 mois de traitement, 80 % en masse des HAP sont dégradés.

I.3.5.4 La phytoremédiation

Certaines plantes permettent de transformer (phytoremédiation) ou stabiliser (phytostabilisation) les polluants dans les sols. Les racines de celles-ci sont étroitement associées à une microflore bactérienne et fongique.

Jusqu'alors la phytoremédiation était essentiellement appliquée aux métaux lourds, mais de récentes études ont montré que cette technique était utilisable pour les HAP (**Ballerini**, 1998). Cependant, les mécanismes sont encore mal compris (**Binet et al**, 2000).

La phytoremédiation peut se faire à l'aide de diverses espèces végétales : avoine, lupin, colza (**Liste et Alexander**, 2000), ray-grass (**Binet et al**, 2000). Dans la plupart des cas, la phytoremédiation a été étudiée sur des sols riches en argile.

Ballerini (1998) indique que le système fibreux racinaire de l'herbe facilite à la fois l'accessibilité des contaminants et le métabolisme microbien.

Les rendements d'élimination varient avec le nombre de cycles des HAP. **Binet et al.** (2000) ont observé une augmentation de la dissipation ou de la biotransformation de plusieurs HAP, incluant ceux de cinq et six noyaux aromatiques. Ces auteurs indiquent cependant que les meilleurs taux d'élimination sont obtenus pour les HAP de trois cycles, comme le phénanthrène ou l'anthracène.

Liste et Alexander (2000) ont obtenu en 8 semaines 74 % d'élimination du pyrène sur un sol avec des plantes. Les rendements chutent à moins de 40 % pour un sol sans plantes.

I.4 Traitement biologique des sols pollués par les HAP

Les procédés biologiques permettent de dégrader les polluants, tels que les HAP, par l'action des microorganismes (bactéries, champignons, etc.) et peuvent être utilisés seuls ou en complément d'une autre technique.

La biodégradation est un élément clé du devenir des polluants organiques dans les sols et aquifères. Elle peut, dans ces milieux, assurer l'élimination complète par minéralisation du polluant (**Vandecasteele et al**, 2001).

La décontamination par voie biologique consiste donc à stimuler un phénomène naturel pour en augmenter le rendement afin de détruire le polluant organique qui peut être utilisé comme source de carbone.

I.4.1 Généralités

I.4.1.1 Microflore des sols

Les bactéries et les champignons, par leur très grande diversité populationnelle et fonctionnelle et leur propriétés physicochimiques (par exemple charge de surface), ont une place privilégiée. En effet, ils développent de nombreuses stratégies énergétiques et nutritionnelles et occupent l'ensemble des niches ou d'habitats même dans des conditions extrêmes de milieu, d'acidité, d'alcalinité, de salinité, de température, d'humidité, etc. (**Girard et al**, 2005).

Le sol constitue un réservoir très important de microorganismes : bactéries et champignons. La densité bactérienne est estimée à $10^6 - 10^9$ par gramme de sol sec des horizons superficiels présentant une biomasse de 1500 kg par hectare pour une profondeur de 20 cm. Les champignons, pour leur part, peuvent former une biomasse atteignant 3500 kg par hectare (**Girard et al**, 2005). Cette microflore est dense et diversifiée. Jusqu'à un passé récent, on n'avait accès qu'aux populations susceptibles d'être cultivées *in vitro* or la microflore cultivable ne représente que 0,1 à 10 % de la microflore totale. Actuellement, on estime le nombre de génotypes microbiens différents par gramme de sol à 10^4 (**Girard et al**, 2005).

Parmi les microorganismes dégradeurs des HAP, nous citerons les bactéries prédominantes *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Actinobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus* et les principaux fongicides : *Trichoderma*, *Penicillium*, *Asperigillus* (**Colin**, 2000).

I.4.1.2. Micro-organismes

Les micro-organismes ont besoin d'énergie et d'éléments vitaux pour se développer, c'est-à-dire pour former la biomasse. Ils acquièrent l'énergie par réduction de substances oxydées.

De nombreux groupes de bactéries peuvent vivre tant dans un milieu minéral qu'organique, en présence ou en l'absence d'oxygène en utilisant, pour leur besoin énergétiques, des donneurs ou accepteurs d'électrons minéraux ou organiques (organismes autotrophes et hétérotrophes, aérobies, aéro-anaérobies, anaérobies).

Selon leurs besoins pour leur alimentation, on distingue :

- Les micro-organismes hétérotrophes qui ont besoin pour se développer de substances organiques telles que les hydrocarbures. C'est ce groupe qui intervient principalement dans les techniques de dépollution biologiques.
- Les micro-organismes autotrophes qui utilisent le mono oxyde de carbone CO, le dioxyde de carbone CO₂ et les composés non organiques réduits.

Selon le type d'accepteur d'électron, on distingue :

- Les micro-organismes aérobies qui ont besoin d'oxygène comme accepteur d'électron pour dégrader les substances organiques.
- Les micro-organismes anaérobies ou aérobies facultatifs, qui peuvent dégrader les substances organiques en présence d'oxygène. En l'absence d'oxygène, le métabolisme est anaérobie.
- Les micro-organismes anaérobies qui n'ont pas besoin d'oxygène pour dégrader les substances organiques, mais qui peuvent tolérer de petites quantités. En dehors de l'oxygène, d'autres accepteurs d'électrons peuvent être mis en œuvre, en conditions peu oxydantes ou en anaérobie strict. Ainsi la dénitrification utilise les nitrates comme accepteur d'électrons.

I.4.1.3. Biodégradation des substances organiques

Les micro-organismes dégradent les composés organiques présents naturellement dans le milieu, et peuvent dégrader les polluants organiques qui sont des produits xénobiotiques (**Lallemand-Barrés, 1995**).

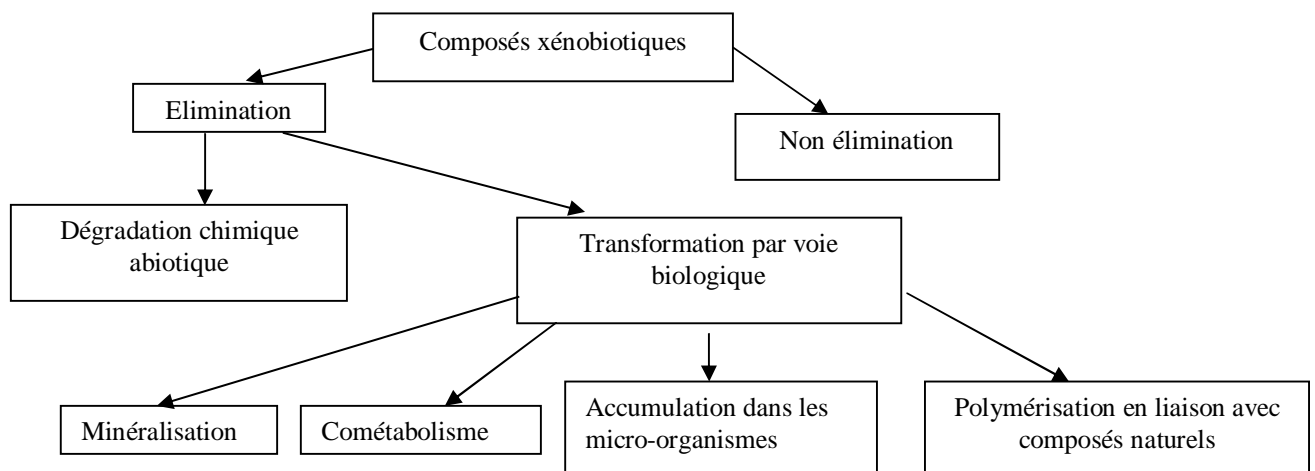
Ratledge (1994) considère que la dégradation des composés organiques est due en grande partie à l'activité des enzymes.

Les processus de biodégradation dans lesquels on exploite les microorganismes pour dégrader les composés xénobiotiques sont identiques aux processus de dégradation naturels (figureI.3).

Quelques définitions sont nécessaires pour comprendre les différents niveaux des réactions biologiques. La biodégradation n'aboutit pas forcément à une minéralisation complète. La minéralisation est l'oxydation totale d'un composé organique en CO₂.

Un composé est dit récalcitrant lorsqu'il résiste à tout degré de biodégradation, tandis qu'il est persistant lorsqu'il ne se dégrade pas dans des conditions données.

Les enzymes sont des protéines capables de catalyser des réactions biologiques très spécifiques. Le cométabolisme est la minéralisation de polluants qui ne fournissent pas d'énergie aux micro-organismes et qui ont besoin d'un apport de substrat.



FigureI.3: comportement des composés xénobiotiques dans l'environnement (**Lallemand-Barrés, 1995**)

I.4.2 Biodégradation des HAP

Les champignons ne sont pas capables d'une dégradation des HAP aussi poussée que les bactéries. Habituellement les HAP ne sont pas minéralisés mais convertis en dérivés polaires par oxygénation (**Namkoony *et al*, 2002**).

La biodégradation des HAP par les bactéries dans son ensemble est un sujet sur lequel les connaissances sont récentes (**Scriban, 1999 ; Bouchez, 1995**).

Les HAP hormis le Naphtalène et le Phénanthrène, étaient considérés comme réfractaires à la biodégradation. Depuis, des bactéries essentielles du groupe CMN utilisant l'Anthracène, le Fluorène, le Pyrène et le Fluoranthène comme seule source de carbone et d'énergie ont été isolées (**Scriban, 1999**).

Le Fluorène a été utilisé comme structure modèle pour étudier la biodégradation des HAP. Cette dernière se fait le plus souvent en conditions aérobies (**Kanaly et Harayama, 2000 ; Samanta *et al*, 2002; Yu *et al*, 2005**).

L'attaque se fait au niveau d'un anneau, en général terminal, grâce à une enzyme, la dioxygénase, donnant une structure de type catéchol. Ensuite, par action d'une seconde dioxygénase, il y a rupture de la structure formée (en ortho ou méta des groupes hydroxyles), suivie par d'autres ruptures. Les sous-produits formés sont généralement plus solubles, plus mobiles et toxiques.

Le tableau I.2 récapitule les demi-vies de quelques HAP dans les sols. Les valeurs varient suivant les auteurs, mais dans tous les cas, les demi-vies de biodégradation des HAP de plus de quatre cycles augmentent considérablement (> 20 jours à des centaines de jours).

En effet, la biodégradabilité est fonction du coefficient de partage octanol/eau : plus il est important et moins le composé sera biodégradable (**Erikson *et al*, 2000**). Cependant les HAP de plus de cinq cycles peuvent être co-métabolisés (**Kanaly et Harayama, 2000; Ho *et al*, 2000**). La co-métabolisation se fait avec un HAP plus léger.

Tableau I.2: Demi-vies des HAP par biodégradation dans le sol (**Colin, 2000**)

HAP	Demi-vie
Fluorène	32 à 60 jours
Phénanthrène	2,5 à 210 jours
Anthracène	170 jours à 8 ans
Fluoranthène	268 jours à 377 jours
Pyrène	199 à 260 jours
Benzo[a]pyrène	0,3 à 58 ans

Le processus de biodégradation est un phénomène complexe et largement dépendant des conditions influant sur l'activité bactérienne, à savoir la toxicité des polluants, les conditions environnementales ou la biodisponibilité des éléments nutritifs (**Ratledge, 1994**).

Généralement, les sites industriels pollués par les HAP sont dits multi-polluants. Par exemple, les sites de traitement du bois (créosote) sont également contaminés par des composés phénoliques.

La présence de contaminants type métaux ou cyanures et/ou de fortes concentrations en solution peuvent ralentir, voire inhiber les processus métaboliques des bactéries (**Hurs *et al.***, 1996), le degré et le mécanisme de toxicité variant avec les micro-organismes exposés.

I.4.3 Voies métaboliques de dégradation des HAP

Les voies métaboliques de dégradation des HAP ont été étudiées par de nombreux auteurs (**Bouchez**, 1995) et ceci plus particulièrement chez les bactéries. Nous présenterons donc en détail les voies de dégradation bactériennes d'un certain nombre de HAP puis nous verrons plus succinctement les mécanismes de dégradation impliqués chez les bactéries et les algues.

I.4.3.1 voies bactériennes

On considère généralement que, chez les bactéries, l'attaque initiale des HAP se fait par l'intermédiaire d'une dioxygénase.

❖ Dégradation du naphthalène

Une première voie de dégradation, étudiée principalement chez *Pseudomonas*, a également été mise en évidence chez *Aeromonas* (**Bouchez**, 1995). Cette voie a été vérifiée et précisée par **Eaton et Chapman** (1992) grâce à l'utilisation d'une bactérie recombinée (figure I.4).

L'étape initiale de la dégradation du naphthalène implique l'incorporation des deux atomes d'une molécule d'oxygène pour former le cis-1,2-naphthalène dihydrodiol. Cette réaction illustrée sur la figure I.5, est catalysée par un système enzymatique multicomposé appelé naphthalène dioxygénase.

Le cis-1,2-dihydroxynaphthalène donne sous l'action d'une (+)-cis-naphthalène déshydrogénase le 1,2-dihydroxynaphthalène qui, après plusieurs étapes enzymatiques est dégradé en acide salicylique. Ce dernier composé évolue, chez la plupart des microorganismes, en catéchol mais il peut également donner l'acide gentisique. Ces deux produits sont des intermédiaires classiques de la dégradation des composés benzéiques et leur métabolisme est bien connu. Ce métabolisme constitue, selon **Bouchez** (1995), la dernière séquence de biodégradation commune aux différents HAP.

❖ Dégradation du phénanthrène

Deux voies de dégradation, illustrées sur la figure I.6, ont été mises en évidence par de nombreux chercheurs qui ont étudié le métabolisme bactérien du phénanthrène. La partie initiale commune aux deux voies métaboliques présente de grandes similitudes avec la dégradation du naphthalène.

I.4.3.2 voies fongiques

Parmi les voies d'attaques des HAP chez les champignons, il faut distinguer celles existant chez les champignons lignolytiques de celles existant chez les autres champignons (**Mougin *et al.***, 1996).

Ces différents mécanismes d'attaques ont fait l'objet de nombreuses études synthétisées par **Mougin** (1996), **Saraswathy** (2002) et **potin** (2004a, 2004b).

• **Cas des champignons non lignolytiques**

Chez les champignons non lignolytiques, l'attaque initiale des HAP est catalysée par une mono-oxygénase. Par cette enzyme, un atome d'une molécule d'oxygène est incorporé dans un cycle aromatique du HAP impliqué qui forme alors un arène oxyde. L'autre atome de la molécule d'oxygène est réduit en eau.

• **Cas des champignons lignolytiques**

Lorsqu'ils sont poussés dans des conditions limitantes en azote, en carbone et en soufre, les champignons lignolytiques produisent des enzymes extra-cellulaires appelées de manière globale ligninases. Ces enzymes permettent l'oxydation de certains composés aromatiques de la lignine.

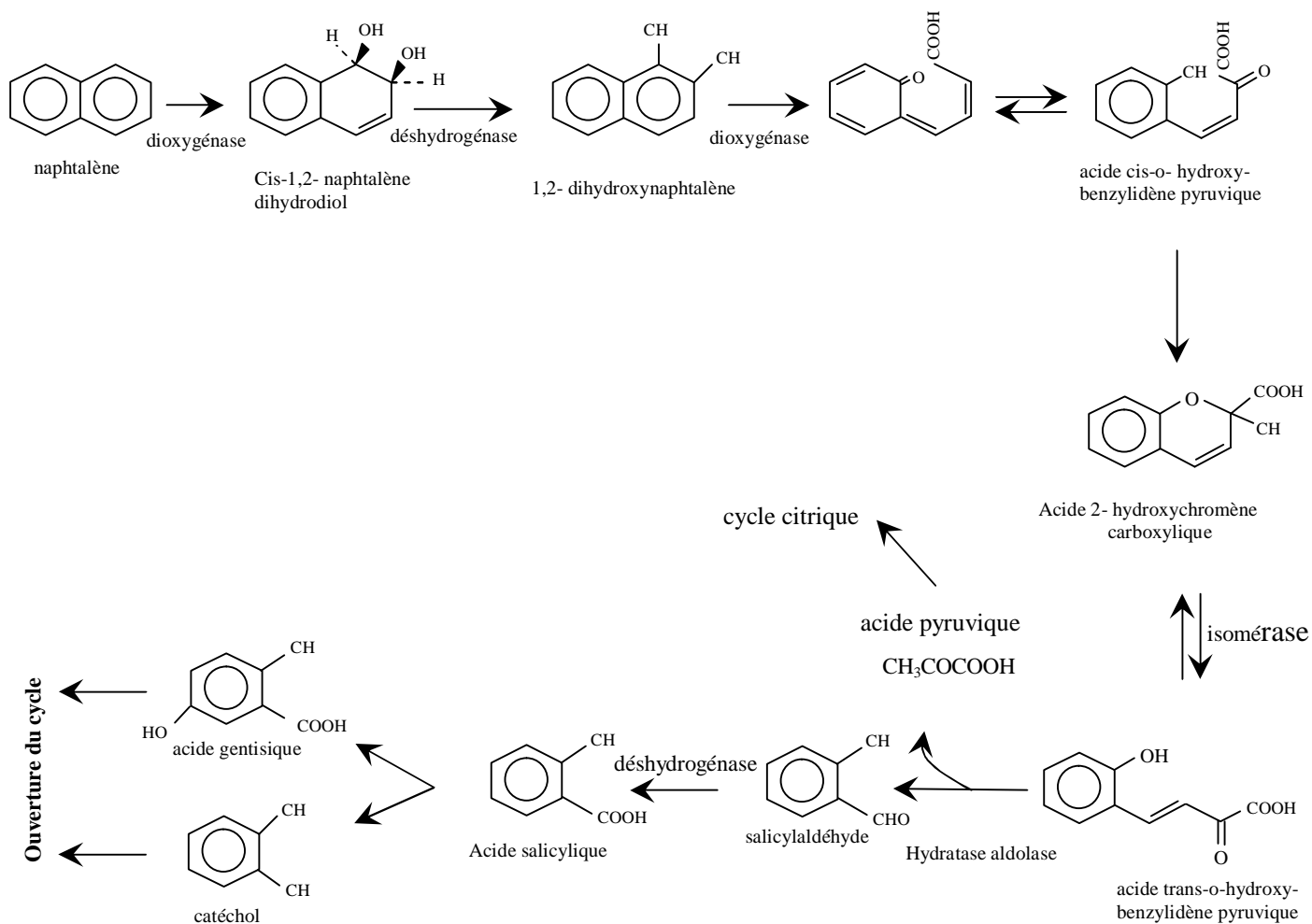


Figure I.4: Voie bactérienne de dégradation du naphthalène (Kwang-Mu.Yent et Irwin Gunsalus, 1985 ; Eaton et Chapman, 1992 ; WSRC, 2000 ; Kuony, 2005)

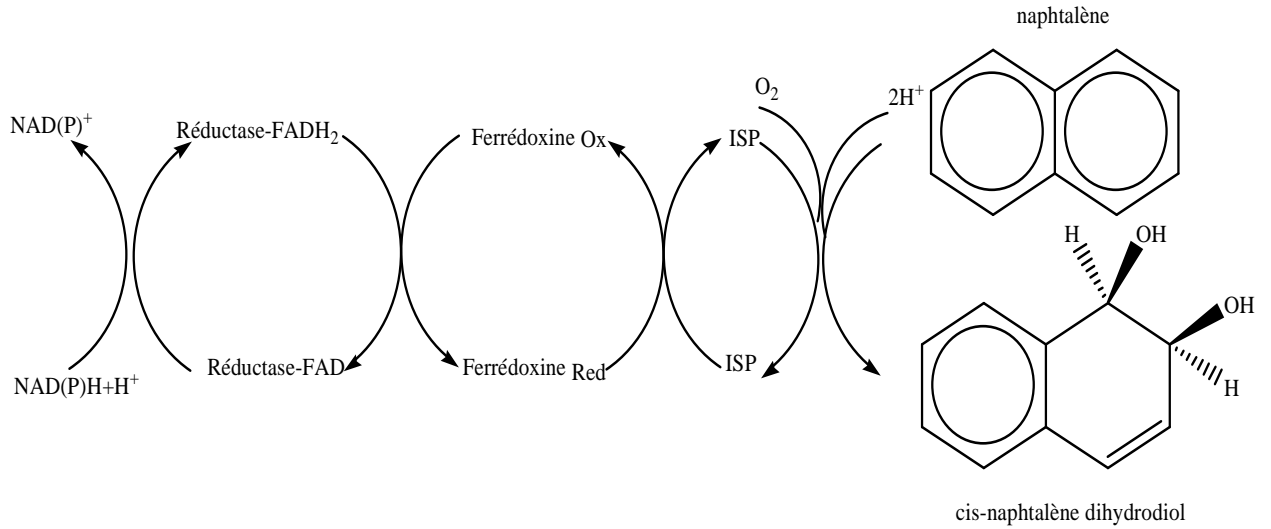


Figure I.5: Mécanisme d'attaque d'un HAP par une dioxygénase cas du naphtalène (Bouchez, 1995)

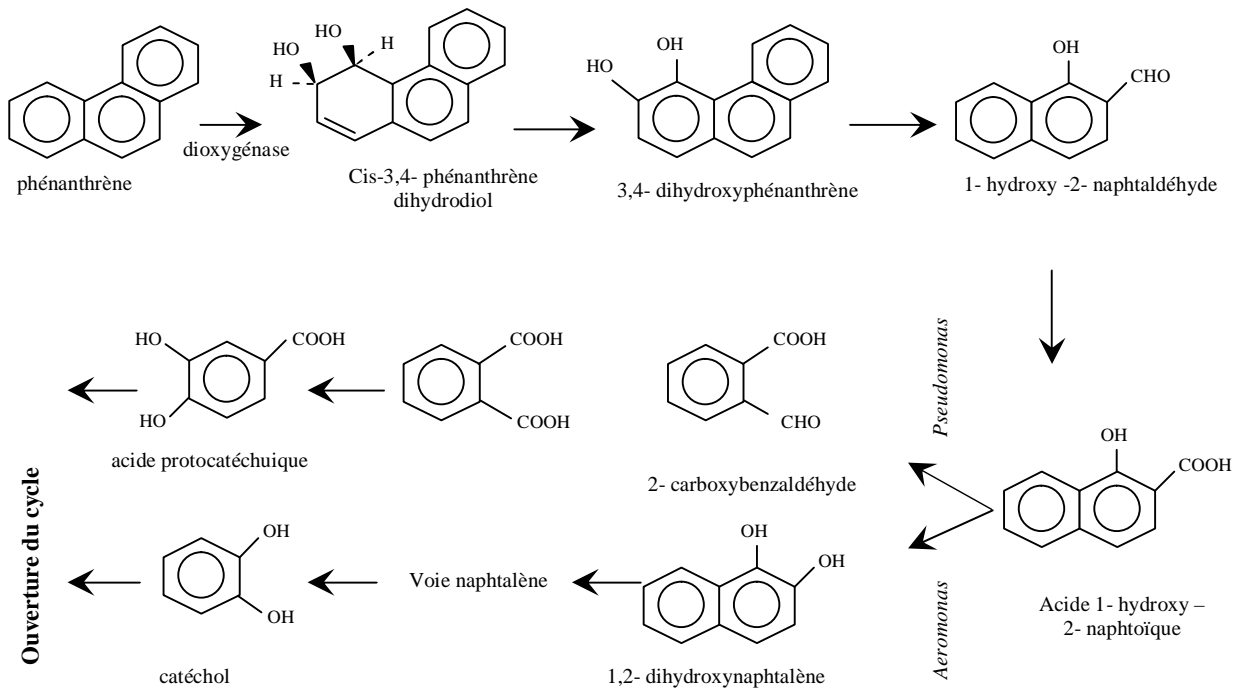


Figure I.6: voies bactériennes de dégradation du phénanthrène (Cerniglia et Heitkamp 1989)

I.4.4 Paramètres de contrôle d'un procédé de bioremédiation

La mise en œuvre des différentes techniques de **bioremédiation** demande souvent une maîtrise de paramètres de contrôle tels que le taux d'oxygène, l'humidité et la température. De plus ces paramètres sont liés au développement des micro-organismes (AFNOR X 31-412, 2000).

I.4.4.1 Teneur en oxygène

La teneur des sols en oxygène est contrôlée par différents facteurs. Un minimum d'espaces occupés par l'air (10% en volume) est généralement considéré comme nécessaire pour l'activité microbienne.

L'oxygène peut être fourni selon **Lecomte** (1995), sous plusieurs formes:

- l'oxygène pur ;
- l'air atmosphérique ;
- le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou « eau oxygénée ».

Des tests, au laboratoire, réalisés par **Jestin-Hurst et al** (1996) ont montré l'effet de la concentration de l'oxygène O_2 sur la dégradation et la minéralisation du pyrène et des seize HAP présents dans le sol. Le taux de dégradation du pyrène et des HAP pour des concentrations en oxygène comprises entre 2 % et 21 %. La minéralisation du pyrène atteint un pourcentage de 45 % à 55 % au bout de 70 jours.

❖ L'aération

Il existe différents moyens pour maintenir l'environnement du sol dans des conditions aérobies. Le labourage est la technique la plus simple pour aérer un sol. Il n'est utile que dans le cas d'une contamination en surface, alors que l'injection sous pression ou l'injection aqueuse permet de traiter plus en profondeur.

L'air peut être introduit dans de milieu poreux en créant une différence de pression soit positive par l'injection forcée, soit négative par extraction sous vide (AFNOR X 31-412, 2000).

Cette technique a été proposée par **Jestin - Hurst et al** (1996) afin d'augmenter le pourcentage en oxygène et ainsi diminuer le temps de remédiation, avec ajout de nouveaux composés.

❖ Injection d'eau oxygénée

Un oxydant tel que l'eau oxygénée H_2O_2 est employé à une concentration comprise entre 200 et 1000 ppm (0,02 à 0,1% en volume). La première difficulté rencontrée avec l'eau oxygénée concerne sa toxicité vis-à-vis des micro-organismes, lorsqu'elle est employée à de fortes teneurs. Cependant, la microflore bactérienne est capable de s'adapter lorsque les concentrations en H_2O_2 sont augmentées progressivement. La réactivité chimique de H_2O_2 aboutit, dans certains cas, à sa décomposition rapide dans le sol et à l'oxydation des substances inorganiques et organiques (AFNOR X 31-412, 2000; Vogel, 2001).

I.4.4.2 Humidité du sol

La description quantitative de la phase liquide repose sur la notion teneur volumique en eau ou humidité. L'eau est un facteur important pour le développement des micro-organismes. L'eau transporte les nutriments vers les cellules, favorise la catalyse des enzymes et maintient la pression osmotique de la cellule (**Vogel, 2001**).

Un micro-organisme, se développant dans un milieu pauvre en eau, devra dépenser de l'énergie pour en extraire l'eau. En dessous d'une certaine teneur en eau, l'activité microbienne cessera et le micro-organisme mourra (**Lallemand-Barrés, 1995**).

Davis et Madsen (1996) ont montré que pour une teneur en humidité de 2 %, il n'y a pas de dégradation du toluène tandis que pour une teneur de 14 % la dégradation est presque complète.

I.4.4.3 pH du sol

Beaucoup de sols naturels sont acides pour avoir une activité microbienne optimale et le problème est exacerbé par une forte fertilisation avec certains nutriments et par les pluies acides. La fixation biologique de l'azote crée également une acidité par production d'ions hydronium H^+ (**Vogel, 2001**).

Le contrôle du pH par l'ajout de chaux est utilisé en agriculture et dans les procédés de dépollution pour neutraliser les substances toxiques. Le niveau d'ajustement du pH dépend également de la profondeur de la contamination dans un site.

Selon **Lecomte (1995)**, il convient de rester dans une gamme de pH comprise entre 5,5 et 8,5, les champignons acceptent généralement des conditions plus drastiques que les bactéries.

Il est important de noter que des changements de pH peuvent influencer la dissolution ou la précipitation de certains composés dans le sol. Il faut vérifier que l'augmentation ou la diminution du pH ne mobilise pas des composés dangereux (**AFNOR X 31-412, 2000**).

I.4.4.4 Température

La température, affectant la physico-chimie de l'environnement des micro-organismes, est l'un des paramètres les plus influents sur le taux de biotransformation (**Vogel, 2001**).

Les communautés microbiennes présentes dans les couches les plus proches de la surface du sol seront les plus exposées aux fluctuations de températures quotidiennes et saisonnières. D'où l'intérêt de réguler les radiations solaires et de changer les propriétés thermiques du sol.

La végétation joue un rôle important dans cette régulation. Un sol avec beaucoup de végétation se réchauffera moins, en été, qu'un sol nu et se refroidira moins en hiver. En général, les micro-organismes préfèrent des températures modérées. Par exemple, si la température ambiante varie entre 0°C et 20°C, les micro-organismes indigènes ont souvent une vitesse de dégradation maximale à 20°C (**AFNOR X 31-412, 2000 ; Vogel, 2001**).

I.4.4.5 biodisponibilité des polluants

A côté des facteurs physiques, la disponibilité des polluants est un critère important. Les conditions optimales de dégradation existent lorsque le polluant est dissout en concentration suffisante dans l'eau (**AFNOR X 31-412**, 2000).

Les polluants (notamment les petites molécules) diffusent dans la microporosité des particules de sol ou dans des phases organiques condensées (composés humiques, goudrons) et deviennent ainsi plus difficilement accessibles à l'eau, aux solvants organiques et aux micro-organismes. Pour les molécules plus grosses et donc plus hydrophobes, des liaisons de forte énergie, éventuellement covalentes, peuvent être créées avec les composés organiques des sols en présence d'une activité microbienne, tendant à réduire encore la mobilité des polluants avec le temps.

L'ensemble de ces processus cinétiquement limités et/ou irréversibles tend ainsi à réduire relativement rapidement la mobilité des molécules d'HAP dans des sols riches en matière organique ou en particules microporeuses (comme les argiles).

Ceci explique le rôle de l'apport de matière organique exogène (de type compost) pratiqué pour le traitement de certains sols, qui « stabilise » les polluants davantage qu'il ne stimule leur biodégradation (**Gourdon et Barriuso**, 2002).

L'influence de la matière organique MO sur la biodisponibilité des HAP et son évolution au cours de la minéralisation bactérienne ont été montrées par **Gourlay** (2004).

Des expériences réalisées par **Dictor et al** (2003) mettent en évidence une diminution de la disponibilité du phénanthrène par les bactéries lors du vieillissement du sol.

La biodisponibilité des HAP dépend également du temps de contamination du milieu. En effet, des HAP ajoutés dans des sols déjà contaminés sont plus rapidement dégradés que les HAP dits, anciens, vraisemblablement plus intimement liés à la matrice (**Bernal – Nartinez**, 2005).

CHAPITRE II :

MATERIEL

ET

METHODES

Chapitre II :

MATERIEL ET METHODES

Dans le cadre de la bioremédiation d'un sol pollué par les HAP, dans un bioréacteur fluidisé à jet, nous décrivons le dispositif expérimental utilisé à cet effet et présenterons les différentes méthodes utilisées pour caractériser le sol et doser les HAP étudiés et le dioxyde de carbone CO₂ dégagé.

II.1 Montage expérimental

Le dispositif expérimental, représenté sur la figure II.1, a été mis en place à l'échelle du laboratoire, afin de mener les expériences de bioremédiation sous des conditions aérobies contrôlées. Il est composé essentiellement d'une colonne de fluidisation et d'un circuit d'alimentation en air comprimé.

❖ Colonne de fluidisation

La colonne est un tube en plexiglas (14) d'une hauteur de 470 mm et d'un diamètre intérieur de 62 mm. Elle est munie d'une prise pariétale d'injection des nutriments distante de 50 mm à partir du distributeur. La prise est un piquage en plexiglas, soudée à la paroi orthogonalement. La colonne est maintenue en position verticale à l'aide de brides reliées à des statifs.

❖ Boîte à vent

La colonne est reliée à une boîte à vent (8) de même matériau et même diamètre, et de forme semi-circulaire. Elle reçoit l'air de fluidisation et l'envoie dans la colonne à travers le distributeur d'air.

La buse d'injection de l'air du jet, centrale et axisymétrique, débouche à 30 mm au dessus du distributeur.

❖ Distributeur

Le distributeur (9) est constitué de deux plaques perforées de forme circulaire d'épaisseur de 15 mm chacune. Afin d'éviter que les particules du solide descendent, un tamis d'ouverture de 0,05 mm est placée entre les deux plaques perforées. Au centre du distributeur, un trou de diamètre 1cm est percé afin de permettre à l'injecteur de gaz d'accéder à la colonne de fluidisation.

❖ Alimentation en gaz

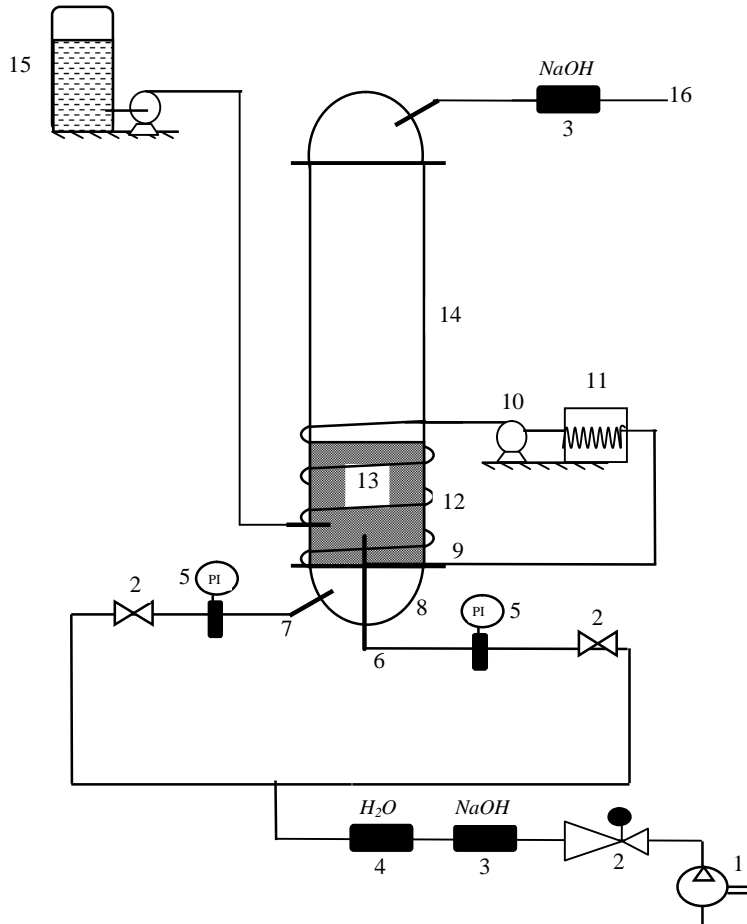
L'air de fluidisation et de jet est fourni par un compresseur (1) de type silencieux détendu grâce à un manodétendeur avant d'être envoyé vers la colonne.

❖ Alimentation en nutriments

Un bac cylindrique en PVC (15), d'une hauteur de 160 mm et d'un diamètre de 120 mm, permet d'alimenter le sol à la base en eau et en nutriments.

❖ **Système respirométrique**

Afin de piéger toutes les traces de CO₂ véhiculées par l'air comprimé, nous avons disposé deux barboteurs contenant pour le premier (3), de la soude NaOH 4N afin de neutraliser le CO₂ et pour le deuxième (4), de l'eau distillée pour prévenir n'importe quelle aspiration de la solution alcaline dans le réacteur. Un autre barboteur (3) est placé à la sortie de la colonne pour piéger le CO₂ issu de la biodégradation.



- | | | |
|--|-----------------------|---|
| 1 COMPRESSEUR | 6 AIR DE FLUIDISATION | 12 SERPENTIN |
| 2 VANNE | 7 AIR DE JET | 13 LIT DE PARTICULE |
| 3 BARBOTEUR contenant NaOH | 8 BOITE À VENT | 14 COLONNE DE FLUIDISATION |
| 4 BARBOTEUR contenant H ₂ O | 9 DISTRIBUTEUR | 15 ALIMENTATION EN NUTRIMENTS ET EN EAU |
| 5 DEBIT METRE à flotteur | 10 POMPE À EAU | 16 SORTIE DE L' AIR |
| | 11 BAIN MARIE | |

Figure II.1 : Montage expérimental

Système de chauffage

Un système de chauffage hydrique est utilisé pour le maintien de la température du milieu solide constante et égale à 20°C. Il est constitué d'un serpentin (12) disposé autour des parois de la colonne et relié à une pompe à eau qui aspire l'eau chaude du bain marie (10) réglé à 60°C.

Mesure des vitesses

Les débits de fluidisation et de jet sont mesurés à l'aide de débit mètres à flotteur (5), étalonnés au préalable (annexe 1).

Les vitesses d'aération et de jet superficielles sont calculées respectivement par les équations (II.1) et (II.2).

➤ Pour la fluidisation :

$$U_f = \frac{Q_f}{A} \tag{II.1}$$

Où

U_f : vitesse de fluidisation

Q_f : le débit volumique de l'air de fluidisation

A : section droite de la colonne

Supprimé : .

Supprimé : .

Supprimé : .

➤ Pour le jet :

$$U_j = \frac{Q_j}{A} \tag{II.2}$$

Où

U_j : vitesse de jet

Q_j : débit volumique du jet

A : section droite de la colonne

II.2 Caractéristiques du sol

II.2.1 Caractéristiques physico-chimiques

La caractérisation physico-chimique du sol a été réalisée à partir des techniques normalisées.

II.2.1.1 Granulométrie

La distribution de la taille des particules (aussi appelée composition granulométrique) est une des plus importantes caractéristiques du sol, elle a un effet sur beaucoup de ses propriétés, telles que la facilité de labourage, l'humidité disponible, la perméabilité, etc. (SDEC, 2007).

En outre, la détermination de la granulométrie est essentielle pour l'évaluation de la disponibilité des substances pour la flore et la faune, le comportement d'une substance et la détermination de la qualité du sol.

La distribution granulométrique du sol a été faite par la méthode de tamisage qui reste très utilisée (Allen, 1988) pour déterminer le diamètre des particules (annexe 2).

II.2.1.2 Perméabilité du sol

Il s'agit de l'aptitude d'un sol, d'un sédiment, d'un réservoir à se laisser entraîner par l'eau, sous l'effet d'un gradient hydraulique. Elle exprime la résistance d'un milieu à l'écoulement de l'eau qui le traverse. Elle dépend de la structure et de la texture du sol considéré (AFEE, 1989).

II.2.1.3 pH en solution aqueuse pH_{eau}

Le pH des solutions de sol ou des lixiviats est mesuré par un pH-mètre (CRISON Micro pH 2000).

Le pH_{eau} est déterminé selon la norme AFNOR (X 31-103, 1981) par la mesure du pH d'une suspension de sol dans l'eau (rapport masse/volume = 2/5) après deux heures d'agitation puis décantation.

II.2.1.4 Teneur en humidité

L'humidité du sol est définie comme étant la différence entre la masse de la prise d'essai de l'échantillon du sol avant et après séchage rapportée à la masse initiale.

$$H\% = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100 \quad (\text{II.3})$$

Où

m_i : la masse, en gramme, de la prise d'essai avant séchage

m_f : la masse, en gramme, de la prise d'essai après séchage

Le principe est basé sur le séchage de 5 g d'échantillon du sol pendant une heure (une durée optimum obtenue à partir des essais préliminaires) dans une étuve réglée à 105°C selon la norme AFNOR (X 31-102, 1981).

II.2.1.5 Le phosphore

L'échantillon de sol est traité au moyen d'une solution d'hydrogénocarbonate de sodium de pH 8,50 (appelée solution d'extraction), de façon à réduire la concentration des ions calcium, aluminium et fer (III) par précipitation de carbonate de calcium et d'hydroxydes d'aluminium et de fer et de façon à libérer les ions phosphates dans la solution.

La teneur en phosphore de l'extrait limpide est mesurée par une méthode spectrométrique comportant la formation d'un complexe phosphate- molybdate à chaud (ISO 11263, 2000)

Ce dosage sert à quantifier et évaluer le phosphore présent dans le sol au cours du traitement biologique. Les concentrations du phosphore sont obtenues à partir de la droite d'étalonnage réalisée au préalable (annexe 3).

II.2.1.6 L'azote total

La teneur en azote total est déterminée par la méthode Kjeldahl (annexe 4), cette norme a pour principe de minéraliser l'azote organique par l'acide sulfurique en présence d'un activateur de minéralisation, de distiller l'azote ammoniacal formé et de titrer dans une solution acide (AFNOR, 1987).

II.2.2 Analyse bactériologique du sol

Les techniques microbiologiques de dénombrement sont appliquées directement sur les échantillons aqueux. Par contre, l'étude d'échantillon de sol nécessite une étape préalable de mise en suspension en milieu aqueux, seul le surnageant après décantation étant ensuite utilisé (Bouchez, 1995).

Pour isoler et dénombrer les bactéries autochtones (aérobies) du sol, nous avons utilisé la méthode de dilution et d'ensemencement en profondeur sur boîtes de Pétri.

Isolement :

- Préparer des tubes à essais contenant chacun neuf millilitre d'eau physiologique stérile.
- Préparer la solution mère en mélangeant un gramme de sol sec avec dix millilitres d'eau physiologique stérile.
- Agiter la solution à l'aide d'un vortex.
- Préparer, à partir de cette suspension, une série de dilutions.
- Prélever à l'aide d'une micropipette un millilitre de la solution mère et transférer dans un deuxième tube contenant neuf millilitres d'eau physiologique, pour obtenir une dilution de 10^{-1} .
- Prélever ensuite un millilitre de ce deuxième tube pour être transféré dans un troisième tube pour obtenir une dilution de 10^{-2} , et ainsi de suite.

Dénombrement :

- En milieu stérile, prélever un millilitre de chaque dilution à l'aide d'une micropipette (embout stérile) et verser ensuite de la gélose nutritive.
- Après une incubation de 48 heures à 37°C , les colonies sont dénombrées manuellement et à l'œil nu.

II.3 Mesure du gaz carbonique par la méthode respirométrique

Le dioxyde de carbone (CO_2), gaz incolore, incombustible et inodore est déterminé. Il est piégé dans la soude de normalité 4 eqg.L^{-1} (II.4) pour être ensuite titré par l'acide chlorhydrique (HCl) 1 eqg.L^{-1} (II.5) en présence de la phénophtaléine (indicateur coloré approprié), le CO_2 non collecté (NaOH seul) est titré en tant que blanc (Namkoong *et al*, 2002).

Capture de CO_2 :



Le volume de l'acide est mesuré ainsi par l'équation II.5

$$n_a = V_a \times C_a \quad (\text{II.5})$$

Où

n_a : le nombre de moles de l'acide utilisé (en mole)

V_a : le volume de l'acide utilisé (en L)

C_a : la concentration de l'acide utilisé (en mole.L⁻¹)

La respirométrie a été utilisée afin de connaître le devenir du carbone initialement présent dans les HAP étudiés, dégagé et piégé sous forme de CO₂ (équation II.6), soit Q_c (équation II.7).



2 moles de HCl dosent 1 mole de CO₂ soit 12 g de carbone, d'où:

La quantité de carbone Q_c (en grammes) est déterminée comme suit:

$$Q_c = M_c \times n_c = M_c \times \frac{n_a}{2} = 12 \times \frac{C_a \cdot V_a}{2}$$

$$Q_c = 6 \times V_a \times C_a \quad (\text{II.7})$$

Où:

M_c : est la masse atomique du carbone (en g.mole⁻¹)

n_c : est le nombre de mole du carbone sous forme de CO₂ (en mole)

n_a : est le nombre de mole de l'acide HCl utilisé (en mole)

$$\text{avec : } n_c = \frac{1}{2} n_a$$

II.4 Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) étudiés

Le naphthalène, l'acénaphène et le phénanthrène ont été sélectionnés parmi les seize Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (annexe 5) identifiés comme polluants prioritaires par l'Agence Américaine de Protection Environnementale EPA (**Bouchez et al**, 1996 ; **Pichard et Gillet**, 2004).

Selon **Gourdon et Barriuso** (2002), le naphthalène et le phénanthrène sont parmi les molécules de la famille des HAP les plus solubles dans le sol.

Les propriétés physico-chimiques des molécules étudiées ainsi que leurs principales caractéristiques ont été répertoriées dans le tableau II.1.

Tableau II.1 : Propriétés des HAP étudiés

Propriété	HAP	naphtalène	acénaphène	Phénanthrène
Forme physique dans les conditions ambiantes habituelles (à l'état brut)		solide cristallisé, Cristaux lamellaires brillants de couleur blanche, odeur caractéristique.	Solide cristallisé sous forme d'aiguilles	Solide cristallisé, Cristaux monocliniques incolores brillants
Masse molaire (en g.mol ⁻¹)		128,2	154,2	178,2
Point de fusion (°C)		80	93	100
Point d'ébullition (°C)		218	279	338 - 340
Solubilité aqueuse (en mg.L ⁻¹) (à 20 °C)		32,00	3,42	1,00

II.5 Extraction des HAP du sol

II.5.1 Prétraitement de l'échantillon du sol

Les échantillons de sol doivent être séchés avant toute extraction (**Pansu et al**, 1998). Etant donné que les conditions locales d'humidité sont telles que le séchage à l'air est impossible, nous avons opté pour un séchage par chauffage à l'étuve à 40°C avec ventilation. Il y a aussi que peu de modifications des propriétés par rapport au séchage à l'air pour les sols sableux et argileux qui n'influent pas sur notre étude (**Pansu et al**, 1998).

Les échantillons de sol sont conditionnés dans des flacons en verre à joint hermétique (couvercles en plastique). Selon **Lecomte** (1995), le conditionnement en verre est obligatoire pour les produits organiques.

Des précautions ont été prises pendant l'extraction afin d'éviter toute contamination. Ceci exige un solvant de haute qualité ainsi qu'un nettoyage rigoureux du matériel avant les extractions.

II.5.2 Méthodes d'extraction des HAP

L'extraction des HAP du sol a été effectuée par soxhlet et ultrason (annexe 6).

II.5.2.1 Extraction par soxhlet

L'extracteur de soxhlet est un appareil spécialement conçu pour l'extraction continue solide liquide. L'extraction continue est un procédé beaucoup plus long que l'extraction discontinue (ampoule à décanter), mais elle a l'avantage d'être plus complète.

Les extractions ont été effectuées à l'aide d'un soxhlet de capacité de 30 ml en suivant les étapes citées ci-dessous :

- Peser précisément 2 g d'échantillon de sol sec et transférer dans une cartouche en cellulose destinée pour ce type d'extraction;
- Verser 50 ml de dichlorométhane (en utilisant une fiole jaugée de 50 ml) dans un ballon de 100 ml à fond rond de l'extracteur et placer dans un chauffe- ballon adéquat;
- Régler le thermostat de telle manière à obtenir un cycle de 10 minutes, soit une durée d'extraction de 5 heures;
- Laisser refroidir et transférer dans le ballon d'extraction tout le dichlorométhane contenu dans le siphon ainsi que celui restant dans la cartouche;
- Transférer dans la fiole jaugée et compléter au trait de jauge avec le dichlorométhane;
- Mettre à la fin l'extrait dans des petits flacons destinés à la conservation pour analyse de ce type de solution;
- Enfin, analyser l'extrait par HPLC avec les conditions décrites au paragraphe II.6.

Un test préliminaire, qui consistait à effectuer des extractions sur des cartouches vides, nous a permis de constater et vérifier que les HAP étudiés ne s'adsorbent pas sur les cartouches d'extraction.

II.5.2.2 Extraction par ultrason

L'outil utilisé pour effectuer les extractions, dont les étapes citées ci-dessous, est un ultrason de modèle Bioblock Scientifique 88155 (annexe 5).

- Peser précisément 2 g de l'échantillon (sol sec) et transférer dans un flacon en verre;
- Ajouter 50 ml de dichlorométhane (en utilisant une fiole jaugée de 50 ml) et mettre le flacon dans un bain d'eau distillée contenue dans la cuve de l'ultrason;
- Régler l'ultrason de telle manière à obtenir une durée d'agitation ou d'extraction de 30 minutes;
- Filtrer le contenu du flacon à l'aide d'un papier filtre ordinaire;
- Transférer dans la fiole jaugée et compléter au trait de jauge avec le dichlorométhane;
- Mettre à la fin l'extrait dans des petits flacons destinés à la conservation pour analyse de ce type de solution;
- Enfin analyser l'extrait par HPLC avec les conditions décrites au paragraphe II.6.

II.6 Dosage des HAP

L'étude quantitative des HAP contaminant le sol est indispensable pour définir leur comportement dans un milieu poreux (sol stérile) ainsi que la faisabilité d'un traitement biologique (sol non stérile).

Le dosage des trois HAP étudiés est effectué par chromatographie liquide haute performance HPLC. Cette méthode est un outil précieux pour aborder l'étude des polluants organiques des sols, en particulier les HAP (**Lei et al**, 2005).

La chaîne chromatographique est constituée d'une pompe à gradient, d'un injecteur automatique possédant une boucle d'injection de 100 μL et d'un détecteur barrette de diode DAD (photodiode array detector), le volume d'injection est de 5 μL .

La détection par DAD est largement utilisée pour détecter les HAP (**Meyer et Steinhart, 2000; Lei *et al*, 2005**).

Les détecteurs à barrette de diodes permettent de sélectionner les longueurs d'ondes appropriées lors de l'exploitation des résultats et de modifier sans difficulté la ligne de base lorsque les longueurs d'onde sont changées mécaniquement pendant le mesurage. Ils permettent également d'obtenir la confirmation des résultats à partir de la même mesure, par exemple en utilisant des longueurs d'onde différentes et/ou en contrôlant la totalité du spectre (**ISO 13877, 1998**).

La séparation des HAP est assurée par une colonne RP-18 (Waters 46 \times 75 mm Column), à l'aide d'un mélange constitué de méthanol/eau (90/10 en volume). L'élution est réalisée en condition isocratique avec un débit de 1 mL.mn⁻¹.

Avant de procéder aux analyses mais aussi durant les analyses, le système HPLC doit être étalonné. Les droites d'étalonnage des trois HAP sont données en annexe 7.

CHAPITRE III :

RESULTATS

ET

DISCUSSIONS

Chapitre III :

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Actuellement, nous sommes confrontés aux problèmes de déversements d'hydrocarbures en mer et au niveau des champs pétroliers provoquant ainsi la pollution des côtes et des nappes phréatiques. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques HAP sont présents dans de nombreuses contaminations de sols et se caractérisent par leur faible biodisponibilité et leur toxicité vis-à-vis des bactéries endogènes.

La bioremédiation privilégie les traitements *in situ*, mais également ceux en biopiles (traitements *ex situ*) qui sont plus performants et moins coûteux que les réacteurs à boues. C'est pour ces raisons que nous avons choisi de travailler dans un réacteur fluidisé à jet (aération forcée) dans le cas d'un sol sableux que nous caractériserons avant et après pollution. Le sol est pollué au niveau du laboratoire par un mélange de trois HAP, le naphthalène, l'acénaphthène et le phénanthrène.

Une fois les caractéristiques du sol identifiées, les tests de traitabilité sont réalisés à l'échelle laboratoire dans le but d'estimer la faisabilité d'un traitement biologique et d'en optimiser les performances en termes de rendement et de cinétique.

Afin de vérifier et de quantifier la capacité des microorganismes indigènes à dégrader les trois HAP considérés, des essais sur sol stérile et non stérile ont été réalisés dans un réacteur fluidisé à jet.

Différents régimes d'écoulement et d'agitation ont été utilisés en variant les vitesses d'aération avec ou en l'absence de l'air de jet : lit fluidisé et préfluidisé ($U_f, 0$) et lit fluidisé à jet (U_f, U_j). Les vitesses d'aération et de jet considérées sont respectivement $U_f = 7,6 \text{ cm.s}^{-1}$ et $11,7 \text{ cm.s}^{-1}$ et $U_j = 7,6 \text{ cm.s}^{-1}$. Des masses de 600 g de sol artificiellement contaminé et amendé en azote et en phosphore sont introduits dans le réacteur (colonne de fluidisation) pour y être traités. Les prélèvements ont été réalisés après chaque dix heures de traitement.

Le suivi de la dégradation des HAP est réalisé à partir de la détermination des teneurs en HAP et en phosphore et de la biomasse dans le sol ainsi que du dioxyde de carbone dégagé et cumulé au cours du temps.

Le dosage des HAP est effectué par HPLC après extraction par solvant à l'aide d'un soxhlet et d'un ultrason.

III.1 Etude du sol

III.1.1 Localisation

Le sol utilisé provient de la région de Bordj El Kiffan, à l'est de la baie d'Alger. C'est un sol sableux prélevé à proximité d'une bouche d'égout exempte de pollution par les hydrocarbures (Chekir, 2005). Le sol a été séché à l'air libre et tamisé ($d = 0,8 \text{ mm}$) (Amellel *et al*, 2001) puis homogénéisé et conservé à l'abri de la lumière à $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

III.1.2 Caractéristiques physico-chimiques du sol

La caractérisation physicochimique permet d'identifier les différents paramètres, il conviendrait d'ajuster certains de ces paramètres afin d'atteindre les conditions de bon déroulement de la biostimulation. Différentes normes AFNOR décrites dans la partie « matériels et méthodes » ont été utilisées à ce titre. Les principaux résultats sont reportés dans le tableau III.1.

Tableau III.1: Caractéristiques du sol à étudier

Caractéristiques	Résultats
ρ_s ($kg.m^{-3}$)	2604
ψ_v	0,86
ε_0	0,38
d_p (μm)	391
Perméabilité ($cm.h^{-1}$)	4,60
pH	7,60
Humidité (%)	0,72
Azote total ($g.kg^{-1}$)	$5,60.10^{-3}$
Phosphore ($g.kg^{-1}$)	$15,60.10^{-3}$

➤ L'analyse granulométrique met en évidence une texture sableuse du sol à étudier (annexe 2). Elle a permis de déterminer les différents diamètres des particules non sphériques (annexe 2) dont le diamètre harmonique est:

$$d_h = \frac{\sum m_i}{\sum \frac{m_i}{d_i}} \quad (III.1)$$

Ainsi nous avons pu déterminer les vitesses minimales théoriques de fluidisation $U_{mf} = 9,46 \text{ cm.s}^{-1}$ et de jet $U_{mj} = 19,20 \text{ cm.s}^{-1}$ dans le cas du sol sec (annexe 8).

➤ Le sol est suffisamment perméable pour permettre le transfert entre les différentes phases et une bonne oxygénation.

➤ Le pH (7,6) de la solution de sol se situe dans la marge optimale favorable à la biodégradation des HAP citée par plusieurs auteurs (**Lecomte**, 1994; **Battle et NFESC**, 1996; **Ballerini**, 1999; **Comeau**, 1999) comprise entre 5,5 et 8,5. A cette valeur de pH, l'activité de la flore autochtone du sol, dégradante les HAP, est maintenue.

➤ Le taux d'humidité du sol de 0,72 % est très faible. Beaucoup de chercheurs (**Ballerini**, 1999; **Margesin et Schinner**, 2001) considèrent que la teneur en humidité est un facteur limitant important dans la biodégradation. **Ballerini** (1999) préconise un taux d'humidité aux alentours de 10 %.

➤ Les nutriments (N, P) sont présents en quantités insuffisantes, ce qui a nécessité l'ajout d'une source d'azote (NH_4NO_3) et une source de phosphore (KH_2PO_4). Les quantités de chaque entité ont été évaluées sur la base du rapport massique C/N/P fixé à 100/10/1 (**Smith et al**, 1997; **Ballerini**, 1999).

III.1.3 Analyse bactériologique

L'analyse bactériologique du sol, après isolement et dénombrement des souches autochtones, confirme la présence de $2,6 \times 10^6$ UFC/g de sol avant contamination. La norme pour toute biodégradation du sol exige au moins une teneur de 10^6 UFC/g de sol (**Battle et NFESC**, 1996). Cela nous permet d'affirmer que le sol étudié peut être traité par procédé biologique en utilisant les bactéries déjà existantes (autochtones).

III.1.4 Contamination du sol

Dans le présent travail, les études de dégradation biotique et abiotique du sol ont été réalisées avec un taux de contamination de 40 g.kg^{-1} soit 13,33 grammes de chaque HAP par kilogrammes de sol sec.

La procédure de contamination adoptée est celle décrite par **Smith et al** (1997). Une solution des trois HAP est préparée par dissolution de ces derniers dans du dichlorométhane et mélangée avec le sol suivant un rapport sol/solution égal à 30 (m/v). Durant la période d'adaptation, le solvant s'est évaporé naturellement tandis que le sol est régulièrement homogénéisé.

La caractérisation du sol après contamination met en évidence que l'addition des HAP n'affecte pas le pH et l'humidité du sol qui sont de 7,6 et 0,72 %, respectivement.

Après quinze jours de pollution, la flore microbienne du sol contaminé, amendé et maintenu à un taux d'humidité suffisant atteint une valeur de 10^9 UFC/g de sol. Ceci confirme que les HAP étudiés n'ont pas d'effet toxique à priori sur les microorganismes du sol.

III.2 Essais préliminaires de l'évolution de la teneur en humidité dans le lit

L'humidité est un facteur de grande importance pour la croissance et le développement des microorganismes qui interviennent dans les processus de biodégradation et les différents transferts. Aussi, il est indispensable que le sol conserve un taux minimum durant le traitement.

Les taux d'humidité préconisés varient selon les auteurs, **Ballerini et al**. (1998) proposent 10 %, **Davis et Madsen** (1996) 14 % tandis que **Nano et coll.** (2003) suggèrent un taux d'humidité supérieur ou égal à 15 %. Nous avons opté pour un taux d'humidité de 10 %.

Pour maintenir la teneur du sol en eau constante, égale à 10 % et compenser les pertes par évaporation, nous avons suivi l'évolution temporelle du taux d'humidité pour les différents essais dans le cas d'un sol non pollué, selon que l'on opère dans un lit aéré, en l'absence de jet ($U_f, 0$) ou en présence de jet (U_f, U_j).

Cette opération a permis de déterminer les quantités d'eau requises au cours du traitement biologique du sol pour maintenir la teneur en humidité constante durant toute l'opération de traitement. A cet effet, un système d'aspersion continu a été utilisé pour alimenter le lit par la partie inférieure au dessus de l'injecteur.

La figure III.1 présente l'évolution de la teneur en humidité en fonction du temps dans le cas des systèmes ($U_f = 11,7 \text{ cm.s}^{-1}$; $U_j = 0,0 \text{ cm.s}^{-1}$) et ($U_f = 11,7 \text{ cm.s}^{-1}$; $U_j = 7,6 \text{ cm.s}^{-1}$), correspondant respectivement à des débits d'aération de $21,2 \text{ L.min}^{-1}$ et $35,0 \text{ L.min}^{-1}$.

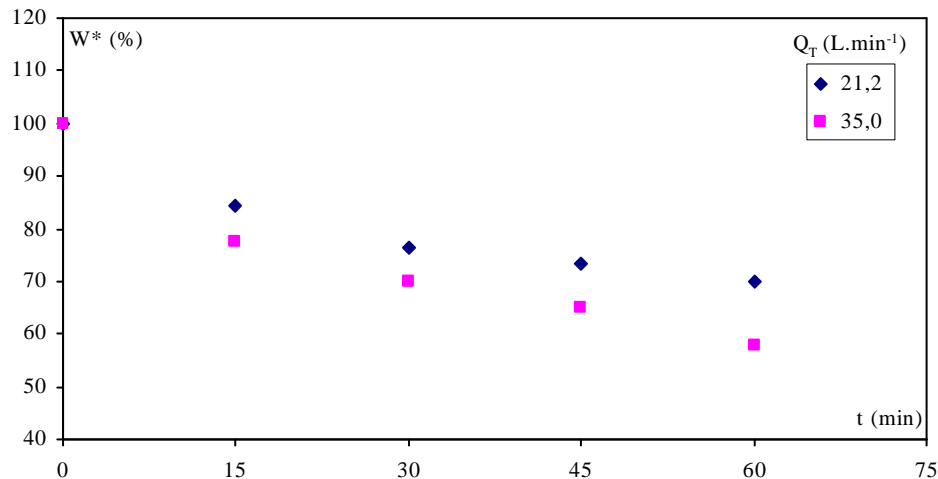


Figure III.1 : Evolution de l'humidité réduite en fonction du temps

Les courbes de séchage pour les différents essais, présentent la même allure. A partir des résultats obtenus (figure III.1), nous remarquons que l'humidité du sol est fortement influencée par l'aération. Au bout de quinze minutes seulement la teneur en humidité diminue d'environ 15 % pour un débit total de $21,2 \text{ L.min}^{-1}$ et de 22 % pour un débit de 35 L.min^{-1} .

Après 60 minutes d'aération, l'abattement du taux d'humidité du sol atteint 30 % dans le cas d'un lit fluidisé et 42 % dans le cas d'un lit fluidisé à jet.

La similarité des deux allures, dans notre cas, nous permet de dire qu'il n'y a pas une grande différence entre le séchage du sol en lit fluidisé et en lit fluidisé à jet. Donc la présence de jet n'affecte pas vraiment la cinétique du séchage du sol dans le lit.

La figure III.2 représente l'évolution de la vitesse de séchage du sol en fonction du temps. Il ressort que plus la vitesse d'aération est élevée, plus la cinétique de séchage est importante. Les allures des cinétiques de séchage sont similaires et présentent deux phases.

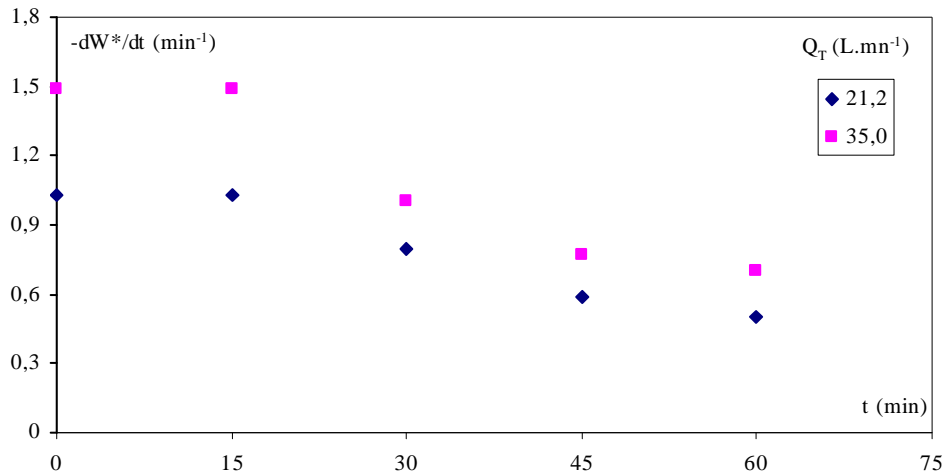


Figure III.2 : Evolution de la vitesse de séchage en fonction du temps

Une première phase où la vitesse de séchage est constante, correspondant à la première partie linéaire de l'évolution temporelle de l'humidité avec l'aération. Pendant ce temps, la surface du solide est saturée en eau. Il s'y forme une couche limite de gaz où la pression de vapeur d'eau est quasi égale à celle de l'eau pure dans les mêmes conditions de température et de pression. Cette situation résulte de la présence d'eau en quantité importante à la surface du solide. Ce qui provoque la vaporisation de l'eau à la surface.

La deuxième phase correspond à la phase où la vitesse de séchage est décroissante et le transfert de l'eau au sein du solide n'est plus assez rapide pour saturer la pellicule de gaz entourant celui-ci. Il se crée dans les particules un front de vaporisation se dirigeant progressivement vers l'intérieur de la matière à sécher. La vapeur d'eau ayant un chemin de plus en plus important à parcourir, sa pression à la surface du solide diminue. La différence entre cette pression et la pression de vapeur d'eau dans le milieu ambiant va donc décroître avec comme conséquence la diminution de la vitesse de séchage.

A partir du tracé des cinétiques de séchage pour les différentes conditions d'essais, nous avons déterminé les différents débits d'eau nécessaires pour maintenir un taux d'humidité moyen constant égal à 10 % à partir de la vitesse de séchage en phase constante. A cet effet, un système d'aspersion continu a été utilisé pour alimenter le lit par la partie inférieure.

III.3 Efficacité de la méthode d'extraction des HAP

L'extraction des HAP du sol a été réalisée par soxhlet et par ultrason en utilisant du dichlorométhane comme solvant.

Des études effectuées par **Gabet** (2004) ont montré que le dichlorométhane est le solvant qui extrait le mieux les HAP. En effet, le choix du solvant ne dépend pas seulement des molécules à extraire mais aussi des conditions analytiques, ainsi que de la nature de la matrice polluée (**Gabet**, 2004).

Le tableau III.2 illustre un exemple des résultats d'analyse des HAP étudiés, extraits par les deux méthodes, dans le cas d'un échantillon de sol stérile prélevé au temps initial (t_0), après 15 jours d'incubation et avant traitement.

Tableau III.2: Concentrations moyennes des HAP extraits par soxhlet et ultrason après 15 jours d'incubation (sol stérile)

Polluants	C_0 (g.kg ⁻¹)	$C_{soxhlet}$ (g.kg ⁻¹)	$C_{ultrason}$ (g.kg ⁻¹)	$\frac{C_{soxhlet}}{C_{ultrason}}$
Naphtalène	13,33	5,990	3,568	1,68
Acénaphène	13,33	10,558	6,519	1,62
Phénanthrène	13,33	11,646	7,233	1,61
HAP totaux	39,99	28,194	17,320	1,63

Où :

C_0 : Concentration introduite du polluant

$C_{soxhlet}$: Concentration du polluant extrait par soxhlet après 15 jours d'incubation

$C_{ultrason}$: Concentration du polluant extrait par ultrason après 15 jours d'incubation

Il ressort des résultats de mesure des HAP étudiés que les teneurs déterminées après quinze jours d'incubation diffèrent de celles introduites et en particulier dans le cas du naphtalène (55 % ÷ 73 %).

Dans tous les cas d'extraction, la concentration du phénanthrène est plus élevée que celle de l'acénaphène et du naphtalène. Ces différences pourraient être en outre attribuées aux processus abiotiques impliquant la volatilisation.

Dans ces conditions, il faut noter que la différence des taux de volatilisation des HAP étudiés est étroitement liée à leur poids et leur solubilité dans l'eau. En effet, le naphtalène est le polluant le plus léger ($M = 128 \text{ g.mole}^{-1}$) des 16 HAP cités dans la bibliographie et le plus soluble avec 32 mg.L^{-1} , tandis que l'acénaphène et le phénanthrène sont plus lourds, avec les solubilités respectives de 3 mg.L^{-1} et 1 mg.L^{-1} .

Ophoff et al (1996) montrent que l'humidité du sol influence les taux de volatilisation des HAP via l'évaporation de l'eau du sol. Ils mettent en évidence que le taux de volatilisation est également fonction de la sorption du HAP dans le sol.

Gabet (2004) rapporte que dans le cas du naphtalène fraîchement introduit dans un sol pauvre en carbone organique et un taux d'humidité de 60 %, le taux de volatilisation atteint 30 % après deux jours. Dans le cas des HAP à trois cycles (anthracène et phénanthrène), l'auteur n'observe pas de volatilisation (moins de 0,1 %).

Les quelques expériences de volatilisation réalisées jusqu'ici sont effectuées peu de jours après la contamination artificielle. Les taux d'enlèvement des HAP ne tenaient pas compte de l'âge de la contamination, qui a pour effet de les réduire.

Il ressort de la comparaison des concentrations mesurées et données dans le tableau III.2 avec celles introduites dans le sol (C_0), que c'est la méthode d'extraction par soxhlet qui donne de meilleurs résultats que celle par ultrason, indépendamment du HAP étudié.

Une valeur approximative de 1,6 a été obtenue en divisant la valeur de la concentration obtenue par soxhlet sur celle obtenue par ultrason comme l'illustre le tableau III.2. Ce qui veut dire que la quantité (de chaque HAP) extraite par soxhlet est presque le double de celle extraite par ultrason.

Par ailleurs, en se référant à la bibliographie (**Gabet**, 2004), le suivi des teneurs en phénanthrène met en évidence que la méthode de soxhlet permet d'extraire 87 % de la quantité réelle, tandis que la méthode d'ultrason ne permet d'extraire que 54 % de celle-ci, soit 62 % de la quantité moyenne extraite par soxhlet.

Aussi, nous nous référerons dans tout ce qui va suivre aux résultats de dosage des HAP extraits par soxhlet. Cette méthode est souvent citée comme étant très performante, mais peu sélective selon le solvant utilisé. Elle est efficace selon **Gabet** (2004), en utilisant du dichlorométhane comme solvant d'extraction de fluorène et de fluorantène à des rendements respectifs de 78 % et 96 %. Par contre lorsqu'elle a utilisé du méthanol, elle n'a extrait que 52 % et 69 % de ces deux HAP respectivement.

De manière générale et quel que soit le substrat, l'ordre d'efficacité des méthodes d'extraction est différents selon le solvant utilisé (**AFNOR**, 1999; **Perrin-Ganier et al**, 2002).

En effet, **Perrin-Ganier et al** (2002) ont entrepris des extractions des HAP (neuf HAP: naphthalène, phénanthrène, benzo(a)pyrène, etc.) du sol en utilisant un ensemble de méthodes: ultrasonication, micro-onde, agitation, soxhlet et extraction accélérée par des solvants sous pression (ASE). Cette étude a mis en évidence que la méthode ASE s'avère être la plus efficace selon qu'on utilise de l'acétonitrile comme solvant et la moins performante selon qu'on utilise un mélange d'acétone et de dichlorométhane.

III.4 Traitement biologique d'un sol contaminé par les HAP

Le traitement biologique du sol contaminé par les HAP à 40 g.kg^{-1} a été effectué pendant 50 heures dans un lit fluidisé et préfluidisé (lit fixe), les vitesses d'aération respectives étant de $11,7 \text{ cm.s}^{-1}$ et de $7,6 \text{ cm.s}^{-1}$, et dans un lit fluidisé à jet dont les vitesses d'aération et de jet étant respectivement de $11,7 \text{ cm.s}^{-1}$ et $7,6 \text{ cm.s}^{-1}$. Les prélèvements sont effectués (après 10 heures de traitement) à l'aide d'un outil adapté pour un sol sableux et soudé à une tige en acier rigide (**Pansu et al**, 1998). Le sol ainsi pollué, a été amendé en phosphore (à 0,1 %) et en azote (à 1 %), en maintenant la teneur en eau à environ 10 %.

Les HAP peuvent subir des transformations biotiques et abiotiques liées à l'action des micro-organismes du sol et aux processus de volatilisation, de réactions d'hydrolyse ou de réactions photochimiques.

L'hydrolyse et les réactions photochimiques sont négligeables comparés au processus de volatilisation (**Wild et al**, 1990). D'autre part, l'atténuation des HAP du sol par volatilisation est beaucoup plus accentuée dans le cas des HAP à faible poids moléculaire. Le processus de biodégradation est un phénomène complexe et largement dépendant des conditions influant sur l'activité bactérienne, à savoir la toxicité des polluants, les conditions environnementales ou la biodisponibilité des éléments nutritifs.

Afin de déterminer la contribution des phénomènes abiotiques dans les processus de dégradation des HAP, nous avons réalisé les mêmes essais sur sol stérile.

Ce dernier a été au préalable séché à 120 °C pendant 24 heures pour ainsi éliminer tous les microorganismes.

III.4.1 Dégradation abiotique des HAP dans le sol

Les figures III.3 (a, b, c) représentent l'évolution temporelle des trois HAP étudiés pour différents débits d'aération dans le cas d'un sol stérile.

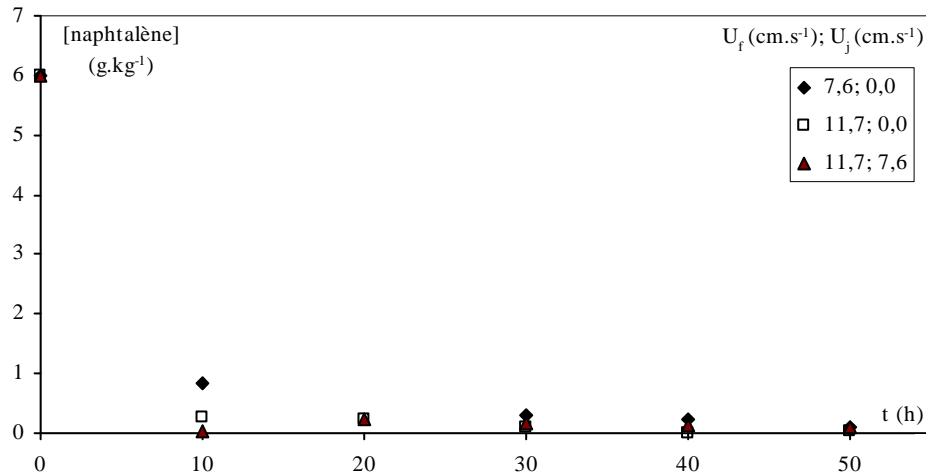


Figure III.3 (a): Evolution de la concentration du naphthalène en fonction du temps
Influence de la vitesse d'aération sur sa dégradation abiotique

L'enlèvement abiotique du naphthalène est très important durant les dix premières heures. Il est d'autant plus important que le débit d'aération total est important. Toutefois, la présence du jet n'affecte pas considérablement l'enlèvement du naphthalène comparé à l'air de fluidisation.

Après 20 heures, le naphthalène est pratiquement totalement éliminé du sol par les processus de volatilisation et de transport, et ce indépendamment de l'état du lit.

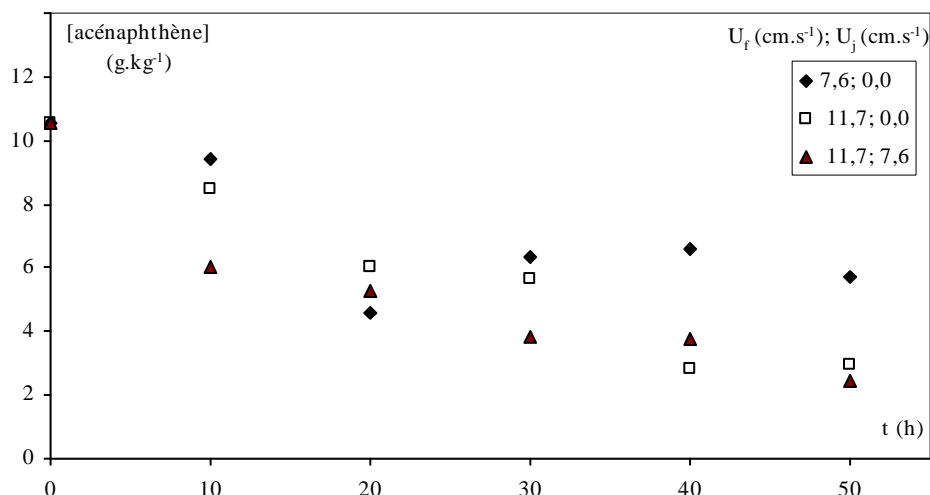


Figure III.3 (b): Evolution de la concentration de l'acénaphthène en fonction du temps
Influence de la vitesse d'aération sur sa dégradation abiotique

L'enlèvement de l'acénaphthène est moins prononcé que dans le cas du naphthalène et est proportionnel au débit total d'aération. Le processus se poursuit et diminue graduellement durant les vingt premières heures, et se stabilise après jusqu'à la fin du traitement.

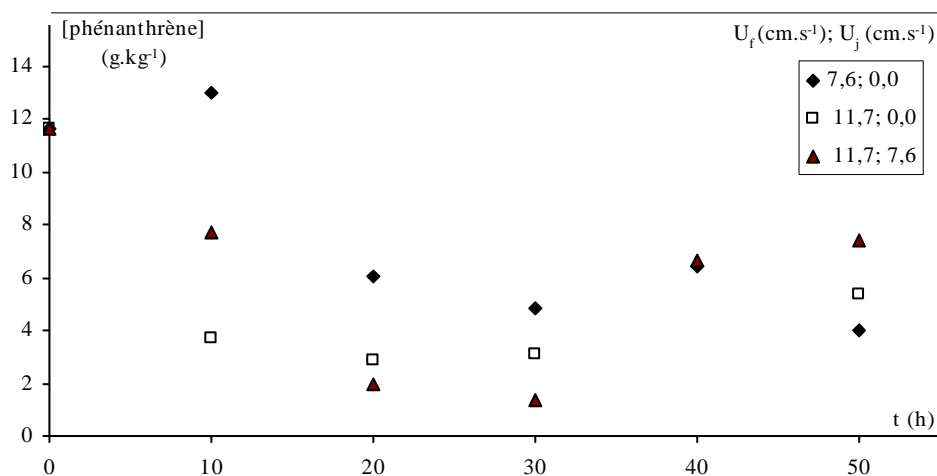


Figure III.3 (c): Evolution de la concentration du phénanthrène en fonction du temps
Influence de la vitesse d'aération sur sa dégradation abiotique

Dans le cas du phénanthrène, une importante réduction est observée les dix premières heures, particulièrement dans le cas du lit aéré (11,7 ; 0,0). Au-delà de 10 heures, le processus s'arrête dans le cas des lits fluidisés avec et sans jet, alors qu'il se poursuit graduellement dans le cas du lit fixe (7,6 ; 0,0).

Il apparaît clairement que l'aération accélère le processus d'enlèvement abiotique du phénanthrène, tandis que la présence du jet réduit le transport de cet HAP en milieu fluidisé.

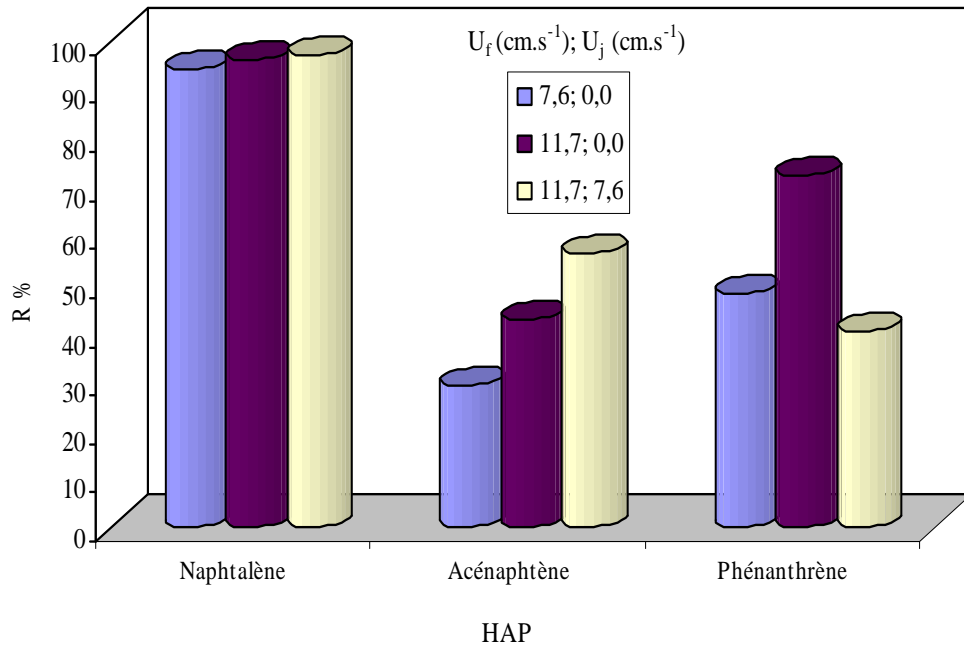
Les figures III.4 (a, b) représentent, pour différents états du lit, les rendements d'élimination abiotique des HAP après 20 et 50 heures.

Il ressort clairement que le naphthalène est totalement éliminé après 20 heures, indépendamment de l'état du lit et de l'intensité de l'agitation. Le taux d'enlèvement du naphthalène se situe entre 94 % et 97 %.

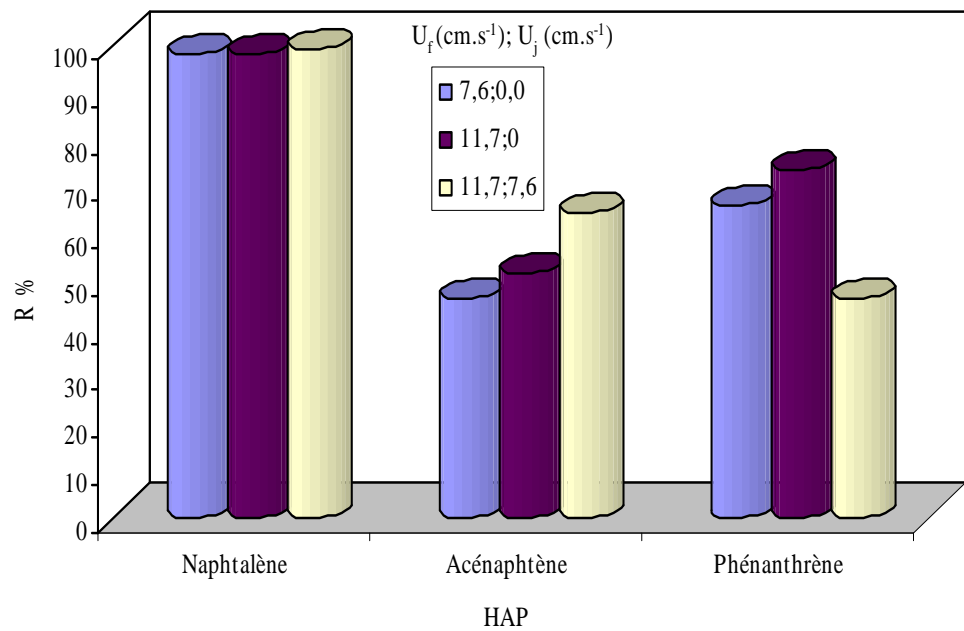
Le rendement d'élimination de l'acénaphthène par les processus abiotiques est proportionnelle au débit total d'aération, et se situe entre 30 % et 56 %.

Le phénanthrène enregistre un taux d'enlèvement abiotique maximal de 72 % après 20 heures dans le cas d'un lit fluidisé.

Après 50 heures, les rendements d'élimination correspondants aux valeurs croissantes du débit injecté sont de 46 %, 52 % et 64 % pour l'acénaphthène et de 66 %, 74 % et 46 % pour le phénanthrène.



a- Après 20 heures de traitement



b- Après 50 heures de traitement

Figure III.4 (a, b) : Rendement d'élimination abiotique des HAP, pour différents états du lit

Afin de comparer entre le comportement des trois HAP étudiés, nous avons représenté sur la figure III.5, l'évolution de leurs teneurs pour un débit d'aération donné.

Le naphthalène présente la plus importante diminution de sa concentration par rapport aux deux autres HAP pour les différentes valeurs du débit et est éliminé après 10 heures de fonctionnement.

En l'absence de jet et dans le cas d'un lit préfluidisé ($U_f / U_{mf} = 0,8$) ou fluidisé ($U_f / U_{mf} = 1,2$), l'évolution des concentrations en acénaphène et en phénanthrène sont pratiquement similaires. L'enlèvement abiotique de l'acénaphène est d'autant plus important que le débit d'aération est élevé. Toutefois, il demeure moins important que l'enlèvement du phénanthrène.

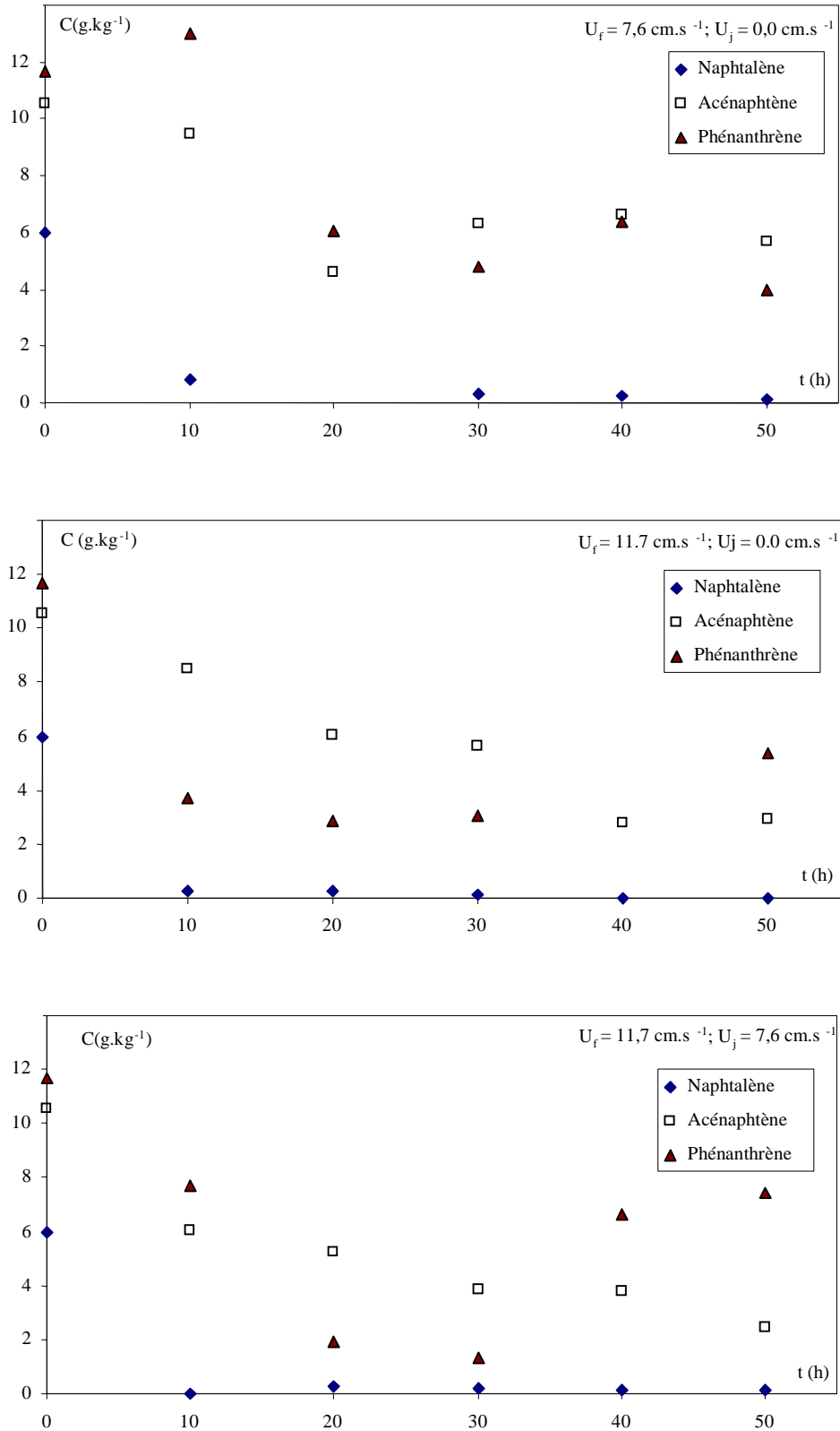
D'autre part, nous remarquons dans le cas d'un lit fluidisé ($U_f = 11,7 \text{ cm.s}^{-1}$), une similarité de la disparition du naphthalène et du phénanthrène

Dans le cas d'un lit fluidisé à jet ($U_f = 11,7 \text{ cm.s}^{-1}$; $U_j = 7,6 \text{ cm.s}^{-1}$), l'enlèvement abiotique des trois HAP étudiés semble étroitement lié à la différence de leurs taux de volatilisation respectifs. Nous remarquons également une similarité de la disparition du naphthalène et l'acénaphène dans ce cas.

Ce résultat met en évidence d'une part que dans les systèmes abiotiques, d'autres phénomènes autre que la volatilisation tel le transport, sont à l'origine de l'enlèvement abiotique. D'autre part, les cinétiques de la disparition du naphthalène et du phénanthrène semblent similaires dans le cas d'un lit fluidisé.

La présence de jet qui favorise les échanges interparticulaires accélère le processus d'enlèvement de l'acénaphène. Une importante réduction de ce dernier est observée comparée à celle du phénanthrène.

Les résultats obtenus peuvent être expliqués par les propriétés des HAP étudiés, ainsi que leur comportement dans le sol (mobilité, volatilisation). Le naphthalène est plus volatile que les autres HAP, il s'élimine donc plus rapidement. La mobilité de l'acénaphène et du phénanthrène est négligeable dans le sol, et leurs taux de volatilisation peu importants.



Figures III.5: Comparaison entre le comportement des trois HAP (sol stérile)

III.4.2 Biodégradation des HAP

L'élimination des HAP étudiés est due aux processus biotique (minéralisation complète, production de biomasse et de métabolites) et abiotique (volatilisation et transport).

Le suivi des teneurs en HAP dans les mêmes conditions d'essai pour les systèmes abiotique et biotique a permis de déterminer l'efficacité du traitement biologique au cours du traitement dans un réacteur fluidisé à jet.

Les teneurs en HAP dans les systèmes biotique et abiotique, mesurées avant traitement sont données dans le tableau III.3.

Tableau III.3: Concentration et rendement de biodégradation des HAP étudiés après 15 jours d'adaptation

HAP	Teneurs initiales dans le sol (g.kg ⁻¹)		R _{bio} (%)
	Stérile	Non stérile	
Naphtalène	5,990	2,471	58.75
Acénaphène	10,558	7,281	31.04
Phénanthrène	11,646	7,421	36.28

Les taux de biodégradation des HAP sont déterminés à partir de l'équation suivante :

$$R_{bio} (\%) = \frac{[HAP]_{t,S} - [HAP]_{t,NS}}{[HAP]_{t,S}} \times 100 \quad (III.2)$$

Où :

$[HAP]_{t,S}$: la teneur en HAP dans le sol stérile au temps t (heures)

$[HAP]_{t,NS}$: la teneur en HAP dans le sol non stérile au temps t (heures)

R_{bio} : le rendement de biodégradation d'un HAP au temps t (heures).

Les résultats de mesure des teneurs en HAP après 15 jours d'adaptation mettent en évidence des rendements de biodégradation importants, supérieurs à 31 % (tableau III.4), et fonction du HAP et également de sa teneur initiale. En effet, nous remarquons que le taux présente la valeur la plus élevée, soit 59 % pour le naphtalène (le HAP le plus léger). La valeur du rendement de biodégradation du phénanthrène est plus élevée que celle de l'acénaphène.

Ces résultats corroborent, d'une part, l'augmentation de la population microbienne dans les systèmes biotiques qui est passée de $2,6 \cdot 10^6$ à 10^9 UFC par gramme de sol sec, et d'autre part, que les différents taux de biodégradation sont attribués à la structure (figure III.6), à la récalcitrance mais également à la mobilité du HAP.

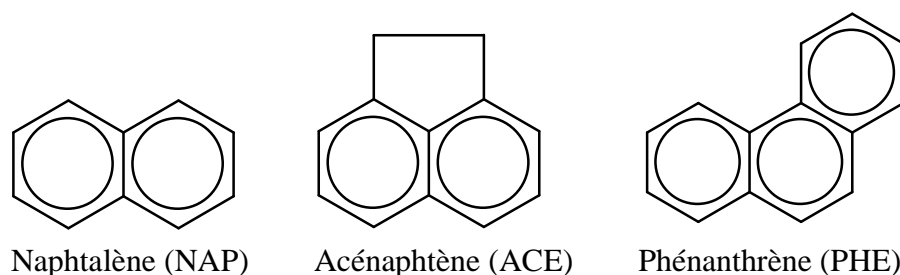


Figure III.6: Structure des HAP étudiés

Les figures III.7, 8 et 9 illustrent l'évolution temporelle des concentrations de chaque HAP dans le sol stérile (dégradation abiotique) et non stérile (dégradation biotique et abiotique).

Dans le cas du naphtalène, une importante réduction est observée durant les dix premières heures tant dans les systèmes abiotiques que biotiques. L'intensification de l'aération et par conséquent l'agitation, ne semblent pas influencer l'enlèvement et la biodégradation de cet HAP.

Au-delà de 10 heures, la raréfaction et la non disponibilité de ce substrat limitent le processus de biodégradation.

La même tendance que celui du naphtalène est observée dans le cas de l'acénaphthène, dans le cas du lit fluidisé à jet. L'introduction de l'air du jet accélère et augmente le taux d'enlèvement de l'acénaphthène dans le système biotique. La biodégradation cesse après 20 heures de traitement, malgré la disponibilité de ce dernier.

A l'inverse dans le cas du phénanthrène, l'intensification de l'aération, en passant d'un état de lit fixe (préfluidisé) à un état de lit fluidisé, augmente les taux d'enlèvement de ce dernier, les processus abiotiques contribuant en grande partie. La présence simultanée de l'air de jet et de fluidisation inhibe l'enlèvement du phénanthrène et le taux de réduction observé est le plus faible.

Nous constatons que l'acénaphthène et le phénanthrène, molécules à trois cycles, sont très peu biodégradables selon le type du réacteur (lit fluidisé avec ou sans jet). Cela laisse supposer qu'ils sont plus complexes et plus récalcitrants que le naphtalène, facilement assimilable mais très volatil, et leur biodégradation nécessite la présence d'une autre source de carbone et d'énergie, en particulier avec la disparition du naphtalène.

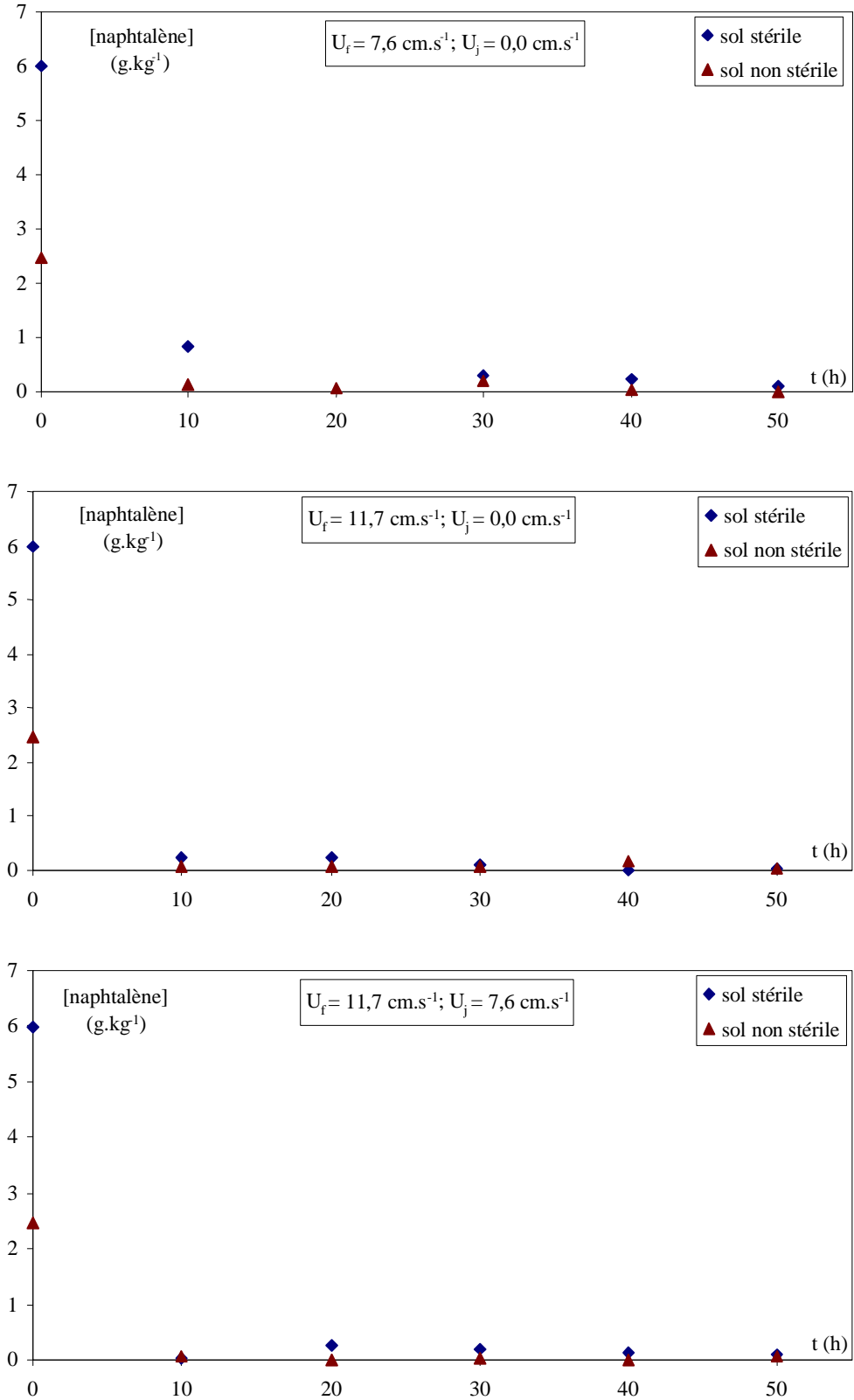


Figure III.7: Evolution de la concentration du naphthalène en fonction du temps, pour différents états du lit

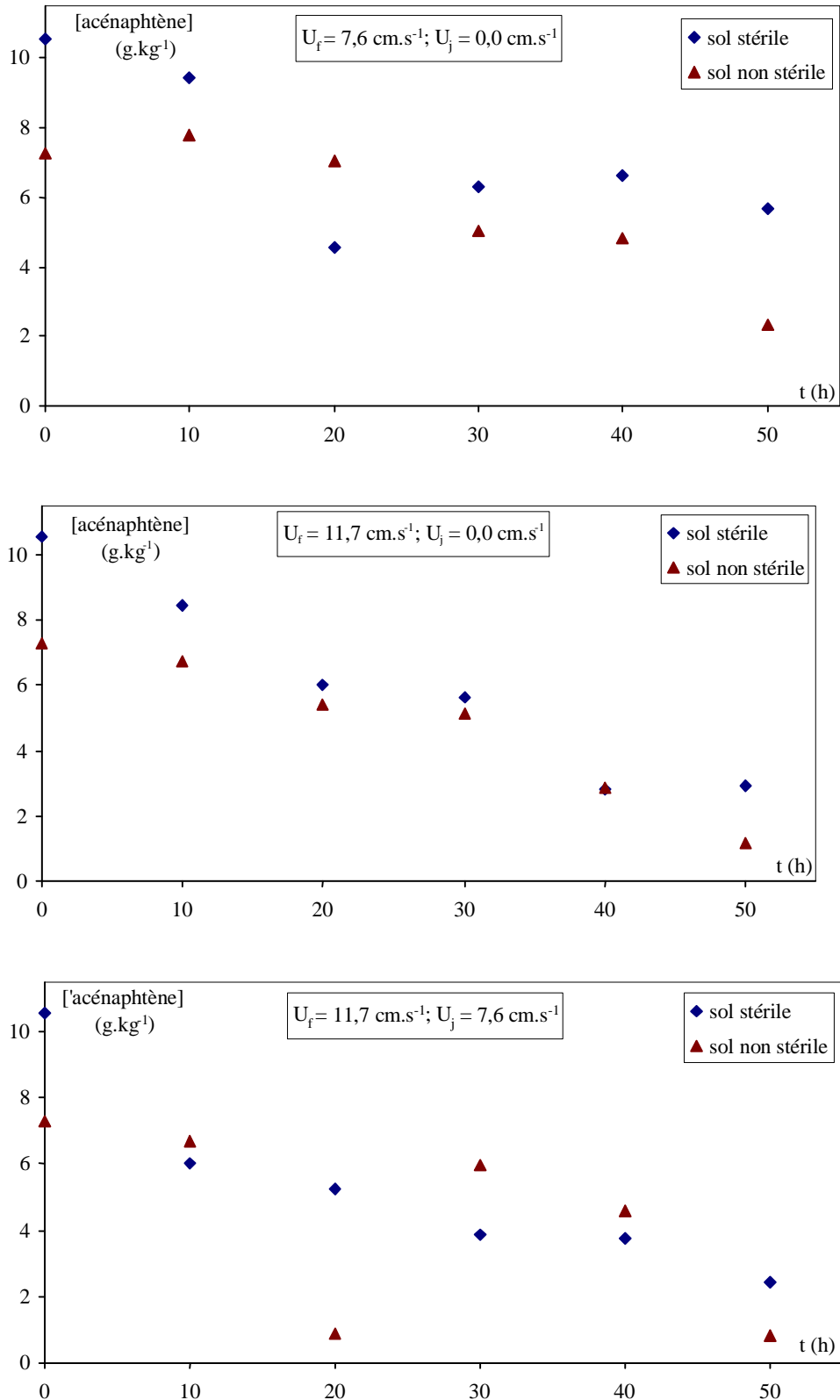


Figure III.8: Evolution de la concentration de l'acenaphthène en fonction du temps , pour différents états du lit

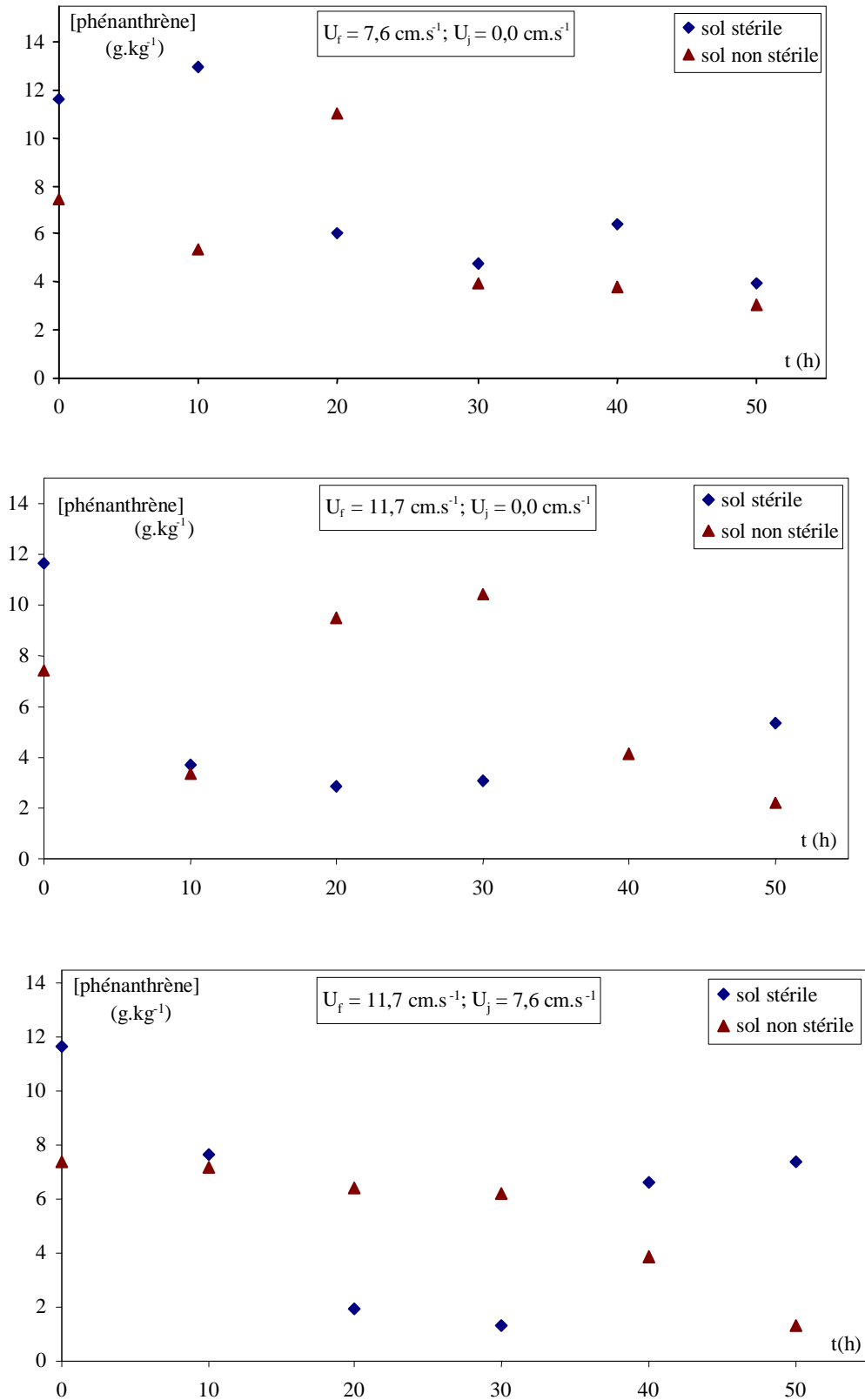


Figure III.9: Evolution de la concentration du phénanthrène en fonction du temps , pour différents états du lit

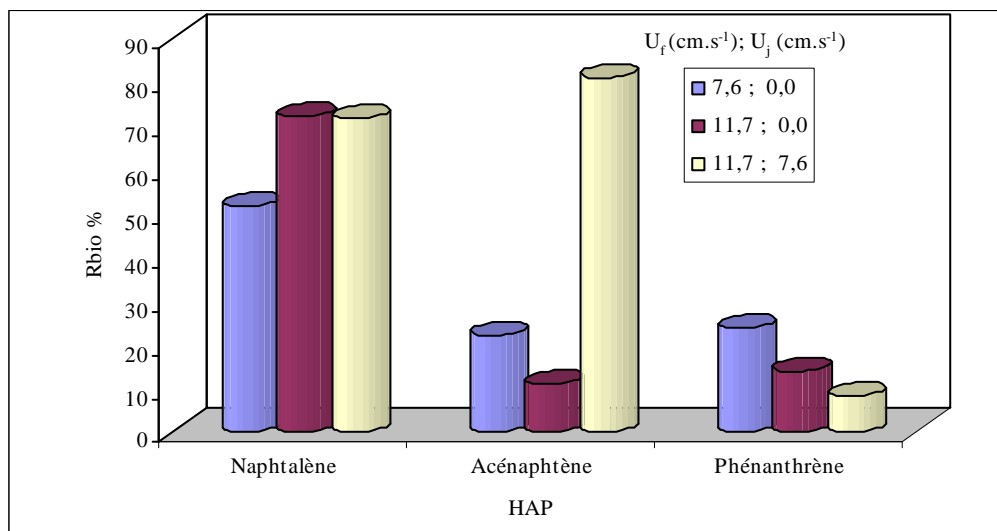


Figure III.10: Rendement de biodégradation des HAP, après 20 heures de traitement, pour différents états du lit

La détermination des taux de biodégradation instantanés à partir de la relation III.2 pour les différents conditions d'essais comme l'illustre l'exemple de la figure III.10, montre que le plus faible rendement de biodégradation du naphtalène (52 %) est atteint dans le cas du lit préfluidisé; par contre aucune différence significative n'apparaît entre les rendements dans le cas des lits fluidisé (72,1 %) et fluidisé à jet (71,7 %).

Il apparaît clairement que la présence de l'air de jet donne les meilleurs résultats de biodégradation de l'acénaphène, tandis que l'influence de l'aération est peu importante. Les taux de biodégradation enregistrés varient entre 11 % et 22 % dans le cas du lit fluidisé et préfluidisé, pour atteindre après 20 heures de traitement, 81 % dans le cas du lit fluidisé à jet.

Le phénanthrène enregistre le plus faible rendement de biodégradation (8 %) dans le cas du lit fluidisé à jet ($U_f = 11,7 \text{ cm.s}^{-1}$, $U_j = 7,6 \text{ cm.s}^{-1}$), comparé au naphtalène ou à l'acénaphène. Le taux de biodégradation est inversement proportionnel au débit total d'air injecté, il atteint 24 % et 14 % dans les cas du lit fixe ($U_f = 7,6 \text{ cm.s}^{-1}$) et du lit fluidisé ($U_f = 11,7 \text{ cm.s}^{-1}$), respectivement.

Le tableau III.4 donne les valeurs des rendements, instantané et moyen, de biodégradation des trois HAP pour différents états du lit.

Tableau III.4: Rendements instantanés de biodégradation des HAP, pour différents états du lit

HAP	Naphtalène			Acénaphène			Phénanthrène		
	fixe	fluidisé	Fluidisé à jet	fixe	fluidisé	Fluidisé à jet	fixe	fluidisé	fluidisé à jet
R₀ (%)	58,7	58,7	58,7	31,0	31,0	31,0	36,3	36,3	36,3
R₁₀ (%)	78,6	82,2	69,9	26,9	23,0	38,8	33,9	12,6	8,7
R₂₀ (%)	51,6	72,1	71,7	22,1	10,8	81,1	23,7	13,8	8,2
R₃₀ (%)	51,6	72,0	71,4	20,3	8,4	78,0	17,5	19,3	9,1
R₄₀ (%)	62,9	75,0	63,2	18,2	9,8	77,3	12,3	21,1	7,1
R₅₀ (%)	93,5	75,5	54,1	17,7	11,8	77,2	15,6	22,7	7,4

Où :

R_t : rendement de biodégradation des HAP au temps t

Nous remarquons que le rendement moyen de biodégradation du naphtalène n'est pas proportionnel au débit total d'air injecté, il est maximal, de l'ordre de (73 %) dans le cas du lit fluidisé.

Il apparaît clairement que la présence de jet donne des meilleurs résultats de biodégradation de l'acénaphène, tandis que l'influence de l'aération est très faible (différence de 7 %). Le taux de biodégradation enregistré varie donc entre 16 et 23 % dans le cas des lits préfluidisé et fluidisé, pour atteindre 64 % dans le cas du lit fluidisé à jet.

Nous constatons que la biodégradation du phénanthrène atteint un maximum dans le cas du lit fixe (lit préfluidisé). Toutefois, on peut considérer que la biodégradation de cet HAP s'est déroulée uniquement durant la phase d'incubation et que l'aération et l'agitation n'ont eu aucune influence. Ce qui n'est pas le cas des deux autres HAP dont la biodégradation est favorisée en lit fluidisé à jet. Nous remarquons aussi que les résultats de biodégradation du naphtalène s'inversent par rapport à ceux du phénanthrène, le taux de biodégradation de ce dernier diminue avec l'augmentation du débit total d'aération.

Le tableau III.5 présente une estimation du rendement global (R_G) de biodégradation des trois HAP présents simultanément, défini comme étant la moyenne des rendements moyens calculés précédemment (voir tableau III.4).

Tableau III.5: rendements globales de biodégradation des HAP pour différents états du lit

Etat du lit	Fixe	fluidisé	fluidisé à jet
R_G (%)	37,4	36,5	50,6

Nous constatons que la présence de jet favorise la biodégradation globale des trois HAP. Par contre, aucune différence significative n'apparaît entre le rendement global dans les cas de lit fixe et de lit fluidisé.

III.4.3 Biodégradation des HAP totaux

Les HAP totaux représentent le mélange des trois HAP étudiés, le naphtalène, l'acénaphène et le phénanthrène. Leur quantification est donc déterminée en calculant la somme des concentrations de ces derniers.

Avant traitement, une durée de 15 jours a été estimée pour que les micro-organismes du sol puissent s'adapter à la seule source de carbone (le naphtalène, l'acénaphène et le phénanthrène) existante dans le milieu. Comme on peut le voir (figure III.11), près de la moitié des HAP (39 %) est biodégradée.

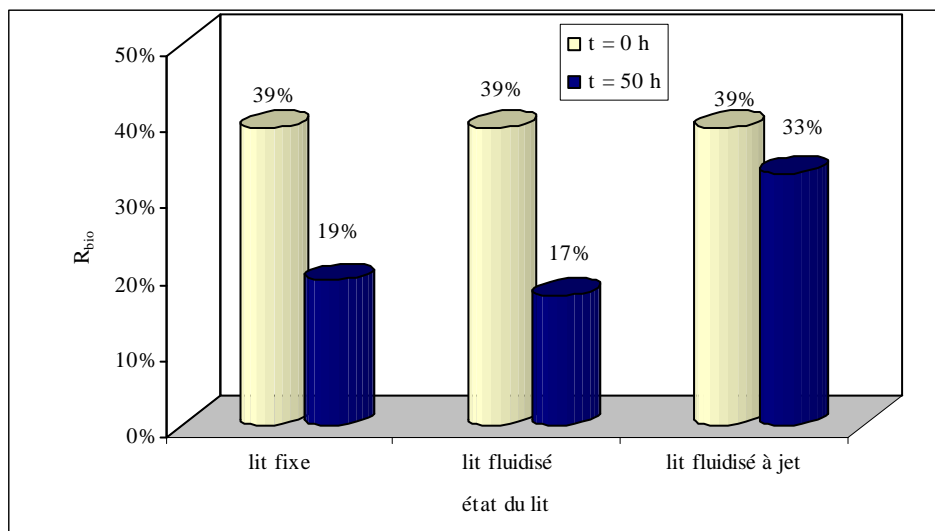


Figure III.11: Rendement de biodégradation des HAP totaux pour différents états du lit

La figure III.11 montre que la présence du jet favorise la biodégradation des HAP totaux. Le meilleur rendement est obtenu donc dans le cas du lit fluidisé à jet à un taux de 33 %. Nous remarquons que l'intensification de l'aération n'influe pas sur la biodégradation des HAP totaux, nous avons obtenu des valeurs de rendement très proches (19 % et 17 % dans le cas du lit fixe et fluidisé).

III.5 Etude de la respirométrie

La respirométrie est la mesure de la vitesse de consommation de l'oxygène par voie biologique dans des conditions contrôlées. Cette dernière étant directement liée à la croissance des cellules et à l'élimination de la pollution, la respirométrie constitue une technique très utile pour caractériser les activités microbiennes de dégradation (Feuilley et Bellon-Manurel, 1999).

L'activité de la biomasse fixée est donc estimée par mesure du dioxyde de carbone CO₂ dégagé issu de la respiration cellulaire (**Bliefert et Perraud, 2004**). Il est piégé en continu dans de la soude 4N (**ISO 16072, 2002 ; Menoreb, 2001**) pour être ensuite dosé par neutralisation avec de l'acide chlorhydrique 1N.

L'oxygène consommé lors de la minéralisation est régi par l'équation suivante :

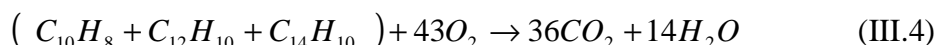


Les valeurs des différentes constantes ($x, y, \alpha, \beta, \delta$) dépendent du HAP impliqué. Elles sont présentées sur le tableau III.6.

Tableau III.6: Constantes de minéralisation des HAP

HAP		naphtalène	Acénaphène	phénanthrène
Valeurs des constantes	x	10	12	14
	y	8	10	10
	α	12	14,5	16,5
	β	10	12	14
	δ	4	5	5
O_2 consommé / CO_2 formé (mol/mol) : α/β		1,20	1,21	1,18

Alors, la réaction globale de minéralisation des HAP totaux est comme suit:



Il apparaît clairement du tableau III.4 que la quantité d'oxygène consommée rapportée à celle du dioxyde de carbone formée, déterminée à partir du rapport α/β , est constante quelque soit la nature du HAP minéralisé (HAP à deux ou trois cycles aromatiques).

L'étude respirométrique a été réalisée dans les cas d'un lit fluidisé ($U_f = 11,7 \text{ cm.s}^{-1}$) et d'un lit fluidisé à jet ($U_f = 11,7 \text{ cm.s}^{-1}$, $U_j = 7,6 \text{ cm.s}^{-1}$) et les résultats de mesure du dioxyde de carbone formé sont donnés dans le tableau III.5.

Tableau III.7 : Résultats de l'étude respirométrique à la fin du traitement

Etat du lit	fluidisé	fluidisé à jet
Quantité de CO ₂ (en mol) mesurée	2.055	3.105
Quantité de O ₂ (en mol) théorique	2.47	3.73

Nous remarquons que la quantité du dioxyde de carbone dégagée et celle de l'oxygène consommée augmentent avec l'augmentation du débit d'air injecté.

Ainsi, nous constatons que la présence de l'air de jet favorise la minéralisation du substrat utilisé par les bactéries autochtones du sol traité.

L'évolution de la quantité de carbone, dégagée sous forme de CO_2 et piégée dans une solution de soude concentrée (4 N), au cours du temps est représentée sur la figure III.12. Elle traduit l'activité respirométrique au cours du traitement.

La quantité de carbone est déterminée après titrage à partir de la relation III.5 (matériels et méthodes).

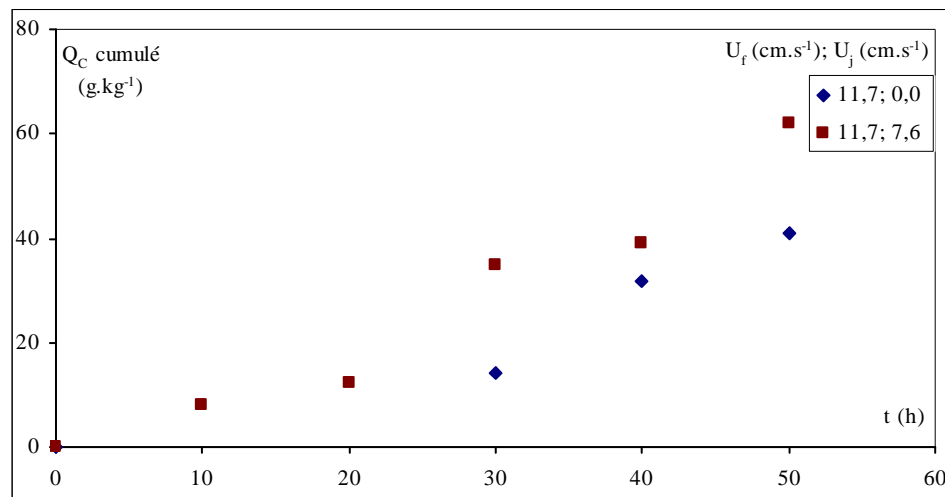
$$Q_c = 6 \times C_a \times V_a \quad (\text{III.5})$$

Où :

Q_c : est la quantité du carbone (en gramme) dégagé et piégé sous forme de CO_2

C_a : est la concentration molaire de l'acide chlorhydrique utilisé pour le titrage

V_a : est le volume de l'acide nécessaire pour neutraliser la solution basique NaOH (4N) dont le dioxyde de carbone CO_2 est piégé



Figures III. 12: Evolution de la quantité de carbone (sous forme de CO_2) en fonction du temps : influence de l'aération

Nous remarquons que la quantité du carbone dégagé augmente au cours du traitement, ce qui montre qu'il existe une respiration cellulaire au niveau du bioréacteur. Elle est plus prononcée dans le cas du lit fluidisé à jet.

La méthode respirométrique adaptée dans notre étude, nous a permis de déterminer le pourcentage de minéralisation des HAP totaux à partir de l'équation suivante (ISO 14855, 1999) :

$$D_t = \frac{(CO_2)_T - (CO_2)_B}{Th(CO_2)} \times 100 \quad (\text{III.6})$$

Où :

$(CO_2)_T$: la quantité cumulée de CO_2 libéré, en grammes

$(CO_2)_B$: la quantité moyenne cumulée de CO_2 libéré par le blanc, en grammes

$Th(\text{CO}_2)$: la teneur théorique de CO_2 susceptible d'être produit, en grammes

$$Th(CO_2) = M_{TOT} \times C_{TOT} \times \frac{44}{12} \quad (III.7)$$

Avec :

M_{TOT} est la masse du sol introduit dans la colonne, en grammes

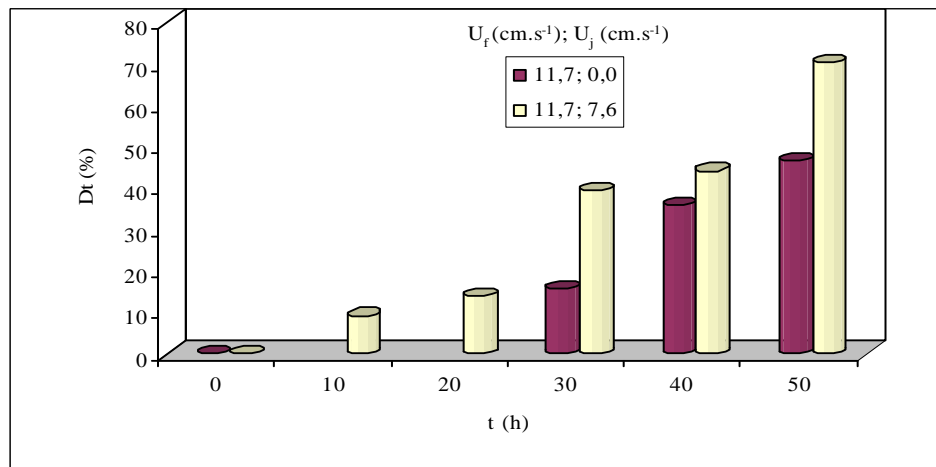
C_{TOT} est la teneur relative en carbone organique total, en grammes par gramme

44 et 12 sont les masses moléculaire et atomique relative du dioxyde de carbone et du carbone, respectivement

Ainsi, après calcul, nous obtenons l'équation ci-dessous :

$$D_t = \frac{100}{88} \times Q_c \quad (III.8)$$

En analysant la figure III.13, nous remarquons que le taux de biodégradation des HAP totaux augmente, tout le long du traitement, avec l'augmentation du débit d'aération injecté. En effet, les rendements obtenus sont de 47 % et 71 % pour des débits de 21 et 35 L.min⁻¹, respectivement. Ces valeurs représentent les pourcentages des HAP totaux dégradés par minéralisation (production de CO₂). Le reste a été, probablement utilisé pour la croissance des microorganismes de la microflore (production de biomasse), sans oublier la contribution des phénomènes abiotiques.



Figures III. 13: Evolution du taux de biodégradation des HAP totaux (déterminé par respirométrie) en fonction du temps : influence de l'aération

Le meilleur rendement (71 %) est obtenu dans le cas d'un lit fluidisé à jet à partir de la méthode respirométrique. Par contre, nous avons déterminé un taux maximal de 33 % seulement en utilisant la méthode d'analyse par HPLC, et cela dans le même cas du lit.

Vu la complication et la délicatesse de l'analyse par HPLC, la respirométrie s'avère plus utile pour déterminer le taux de biodégradation des HAP.

III.6 Evolution de la teneur en phosphore

Le phosphore joue le rôle d'une véritable centrale énergétique à l'échelle bactérienne, il permet la récupération, l'accumulation et la distribution de l'énergie dans la cellule. En effet une faible disponibilité du phosphore limite la croissance bactérienne.

La figure III.14 représente l'évolution de la concentration du phosphore assimilable au cours du temps dans le cas des lits fluidisé ($U_f = 11,7 \text{ cm.s}^{-1}$) et fluidisé à jet ($U_f = 11,7 \text{ cm.s}^{-1}$; $U_j = 7,6 \text{ cm.s}^{-1}$), cas des systèmes biotiques et abiotiques.

Les courbes croissantes, dans le cas du sol stérile, confirment que le sol est bien alimenté en phosphore qui est un facteur limite du développement bactérien. Toute fois il ressort que même dans le cas des nutriments qu'illustre l'exemple du phosphore, il y a phénomène de transport. Plus le débit est important plus faible est l'accroissement de la teneur en phosphore, le sol étant alimenté en continu en phosphore à raison de 0,1 % dans tous les cas.

Dans les systèmes biotiques, la teneur en phosphore diminue également (figure III.14). Cette diminution est plus prononcée en lit fluidisé à jet.

Par ailleurs, les teneurs très importantes en phosphore demeurent suffisantes en terme du traitement et par conséquent la biodégradation des HAP ne peut être limitée.

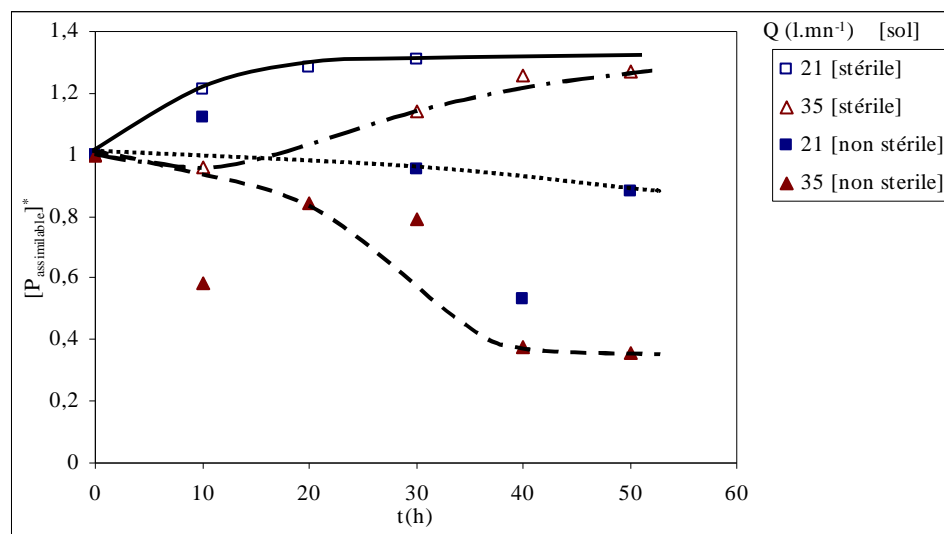


Figure III. 14 : Evolution de la concentration relative du phosphore en fonction du temps (sol stérile et non stérile)

A partir de cette figure nous avons pu comparé entre l'évolution du phosphore dans le sol stérile et dans le sol non stérile qui nous a permis de constater qu'il y a une assimilation du phosphore par les bactéries.

CONCLUSION

CONCLUSION

L'objectif de ce travail a été d'étudier la bioremédiation d'un sol contaminé par les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) modèles (naphtalène, acénaphène et phénanthrène) dans un bioréacteur fluidisé à jet.

Afin d'obtenir les meilleurs rendements d'élimination des HAP, il a été impératif d'optimiser les paramètres influençant la biodégradation. La température et l'humidité sont maintenues respectivement à 20°C et 10 %, et les nutriments suivant un rapport de C/N/P égal à 100/10/1. Le dosage des trois HAP étudiés a été effectué par chromatographie liquide haute performance (HPLC).

Les résultats obtenus ont permis de tirer les conclusions suivantes:

- l'extraction par soxhlet est la méthode la mieux adaptée pour extraire les HAP du sol (par rapport à la méthode d'ultrason);
- l'aération est un facteur important dans la biodégradation des HAP;
- l'élimination des HAP se fait en grande partie après seulement vingt heures de traitement;
- l'élimination abiotique des trois HAP est séquentielle: le naphtalène puis le phénanthrène et enfin l'acénaphène;
- le meilleur rendement de disparition est atteint par le naphtalène, et cela indépendamment de l'état du lit. Le taux d'enlèvement se situe entre 94 % et 97 %;
- le rendement d'élimination de l'acénaphène par les processus abiotiques est proportionnelle au débit total d'aération, et se situe entre 30 % et 56 %;
- le phénanthrène enregistre un taux d'enlèvement abiotique maximal de 72 % dans le cas d'un lit fluidisé ($U_f = 11,7 \text{ cm.s}^{-1}$);
- dans le cas des lits fluidisé et fluidisé à jet, le taux de biodégradation du naphtalène enregistré est de 72 %;
- la présence de l'air de jet favorise la biodégradation de l'acénaphène et atteint un taux de 81 %;
- le meilleur taux de biodégradation du phénanthrène est de 24 %, dans le cas d'un lit fixe ($U_f = 7,6 \text{ cm.s}^{-1}$);
- le phénanthrène enregistre le plus faible rendement de biodégradation (8 %) dans le cas du lit fluidisé à jet ($U_f = 11,7 \text{ cm.s}^{-1}$, $U_j = 7,6 \text{ cm.s}^{-1}$), comparé au naphtalène ou à l'acénaphène;
- vu la complication et la délicatesse de l'analyse par HPLC, la respirométrie s'est avérée plus utile pour déterminer le taux de biodégradation des HAP.

Nous envisageons comme perspectives :

- Des études ultérieures sur les traitements des sols contaminés par les HAP en bioréacteurs fluidisé à jet, il serait avantageux d'étudier la biodégradabilité des HAP lourds (poids moléculaire élevé) seuls et/ou en mélange;
- D'améliorer l'efficacité d'un traitement biologique, on peut réaliser des traitements combinés à l'aide de traitements chimiques utilisant des oxydants (réduction des polluants ayant un nombre de cycles élevé) ou des surfactants (solubilisation des polluants et donc accroissement de la biodisponibilité, c'est-à-dire de l'accessibilité des polluants aux microorganismes);
- Une étude approfondie de l'isolement et de l'identification des espèces microbiennes responsables de la biodégradation des HAP est bien recommandée;

Plusieurs sociétés s'intéressent aujourd'hui aux propriétés des inoculums fongiques (champignons filamenteux). Ils pourraient s'avérer performants pour la dégradation des HAP de gros poids moléculaire, grâce à leur mécanisme d'attaque par des enzymes extracellulaires (ligninases), qui confère au système enzymatique une accessibilité au substrat bien supérieur à celle des systèmes intracellulaires;

- Une recherche de métabolites spécifiques devrait permettre d'avoir une meilleure connaissance des voies de biodégradation des HAP utilisées par les bactéries dégradantes.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- **AFEE (Association Française pour l'Etude des Eaux)**
"Le rôle épurateur du sol" Tome 1, le sol, l'eau et les polluants, Tec & Doc, (1989)

- **AFNOR norme, X31-412, NF ISO 11464**
"Qualité du sol : prétraitement des échantillons pour analyses physicochimiques", (2000)

- **AFNOR norme X 31-103**
"Qualité du sol : mesure du pH (H₂O) - mesure électromécanique", (1981)

- **AFNOR norme X 31- 102**
"Qualité du sol : détermination de l'humidité résiduelle d'échantillon de sol préparé pour analyse", (1981)

- **Alabio F., Marlilly C., Barraqué M.**
" BTEX: Benzène, Toluène, Xylènes", Technique de l'Ingénieur, vol G2, (1989)

- **Alexander R.R., Tang J., Alexander M.**
"Ecological Risk assessment: Genotoxicity in Unrelated to Total Concentration of Priority Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbon in Soils Undergoing Biological Treatment", Journal Environmental Quality, N° 31, pp 150-154, (2002)

- **Allen T., Roux N.**
"Etude de structure: Granulométrie", Technique de l'Ingénieur, vol P1, (1988)

- **Amellel N., Portal J-M., Berthelin J.**
"Effect of soil structure on a bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbon within aggregates of a contaminated soil", Applied Geochemistry, N° 16, pp 1611-1619, (2001)

- **Ballerini D.**
"Traitements biologiques des sols", Technique de l'Ingénieur, vol G2, (1999)

- **Barriuso E., Calvet R., Schiavon M., Soulas G.**
" Les pesticides et les polluants organiques des sols : transformation et dissipation", Forum « le sol un patrimoine menacé ? » pp 279-295, Paris, (1996)

- **Bernal-Martinez A.**
"Elimination des hydrocarbures aromatiques polycycliques présents dans les boues d'épuration par couplage : ozonation–digestion anaérobie" thèse de doctorat, Université Montpellier II, Sciences et Techniques du Languedoc, (2005)

- **Binet P., Portal J.M., Leyval C.**
"Dissipation of 3-6 ring polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere of ryegrass", Soil Biology & Biochemistry, N° 32, pp 2011-2017, (2000)

- **Bliefert C., Perraud R.**
" Chimie de l'environnement: Air, Eau, Sols, Déchets ", Edition De Boeck Université, Bruxelles, (2004)

● **Bogan B.W., Sullivan W.R.**

"Physicochemical soil parameters affecting sequestration and micobacterial biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil", *Chemosphere*, N° 52, pp 1717-1726, (2003)

● **Bouchez M.**

"La biodégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques : métabolisme de substrats non conventionnels", Thèse de doctorat, école nationale supérieure des industries agro-alimentaires, Paris, (1995)

● **Bouchez M., Blanchet D., Haeseler F., Vandelastele J-P.**

"Les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans l'environnement", *Revue de l'Institut Français du Pétrole (IFP)*, Vol 51, N° 3, pp 407-419, (1996)

● **Chekir N.**

"Bioremédiation d'un sol pollué par les hydrocarbures (Gazoil) dans un bioréacteur fluidisé à jet", Mémoire de magister, école nationale polytechnique, Alger, (2005)

● **Colin F.**

" Pollution localisée des sols et des sous-sols par les hydrocarbures et par les solvants chlorés ", Édition Tec & Doc, Paris, (2000)

● **Costes J.M., Druelle V.**

"Les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans l'environnement : La réhabilitation des anciens sites industriels", *Revue de l'Institut Français du pétrole*, Vol 52, N° 4, pp 425-437, (1997)

● **Cerniglia C.E., Heitkamp M.A.**

"Microbial degradation of polycyclic compounds (PAH) in the aquatic environment", CRC Press Inc. Boca Raton, Florida, pp41-68

● **Davis J.W, Madsen S.**

"Factors affecting the biodegradation of toluene in soil" *Chemosphere*, vol. 33, N°1, pp107-130, (1996)

● **Dictor M.C., Berne N., Mathieu O., Moussay A., Saada A.**

"Influence of ageing of polluted soil on bioavailability of phenanthrene", *Oil & Gas Science and Technology – Rev. IFP*, vol 58, N° 4, pp 481-488, (2003)

● **Eaton R.W., Chapman P.J.**

"Bacterial metabolism of naphthalene: construction and use for recombinant bacteria to study ring cleavage of 1,2-dihydroxynaphthalene and subsequent reactions", *Journal Bacterial*, N°175, pp 7542-7554, (1992)

● **Erikson M., Dalhammar G., Borg-Karlson A.K.**

"Biological degradation of selected hydrocarbons in an old PAH/creosote contaminated soil from a gas work site", *Appl. Microbiol. Biotechnol*, N° 53, pp 619-626, (2000)

• **Feuilloy P., Bellon- Manurel V.**

"Matériaux biodégradables et environnement", actes de colloque, Editions Cemagref, Paris, (1999)

• **Gabet S.**

"Remobilisation d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) présents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine biologique", Thèse de doctorat, université de Limoges, (2004)

• **Girard M.C., Walter C., Remy J.C., Bertheline J., Morel J.L.**

"Sol et environnement, cours, exercices et études des cas", Edition Dunod, Paris, (2005)

• **Gourdon R. et Barriuso E.**

"Effet du vieillissement sur la mobilité et la biodisponibilité des polluants organiques dans des matrices poreuses telles que les sols", Association RE.CO.R.D. Contrats N° 00-0405 et 00-0406- Rapport final de synthèse, (2002)

• **Ho Y., Jackson M., Yang Y., Mueller J.G.; Pritchard P.H.**

"Characterization of fluoranthene- and pyrene-degrading bacteria isolated from PAH contaminated soils and sediments", Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, N° 24 pp 100-112, (2000)

• **Hurst C.J., Sims R.C., Sims J. L., Sorensen D.L., Mclean J.E, Huling S.**

"Polycyclic aromatic biodegradation as a function of oxygen tension in contaminated soil", Journal of Hazardous Materials, N° 51, pp 193-208, (1996)

• **INFOS CNRSSP Centre national de recherche sur les sites et sols pollués**

"Biodégradabilité expérimentale des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques", CNRSSP - 930, Bd Lahure - BP 537 - 59505 DOUAI Cedex, (2002)

• **International Petroleum Industry Environmental Conservation Association, IPIECA**

"Directives sur les incidences biologiques de la pollution", Edition IPIECA, Londres, (1994)

• **ISO 11261**

"Dosage de l'azote total, méthode Kjeldahl modifiée", (1995)

• **ISO 11263**

"Qualité du sol : dosage du phosphore, dosage spectrométrique du phosphore soluble dans une solution d'hydrogénocarbonate de sodium", (1981), AFNOR (2000)

• **ISO 13877**

"Qualité du sol: Dosage des hydrocarbures aromatiques polycycliques, Méthode par chromatographie en phase liquide haute performance", (1998)

• **ISO 14855**

"Evaluation de la biodégradabilité aérobie ultime et de la désintégration des matériaux plastiques dans des conditions contrôlées de compostage – méthode par analyse du dioxyde de carbone libéré", (1999)

• **ISO 16072**

"Soil quality: Laboratory methods for determination of microbial soil respiration", (2002)

• **Jeannot R., Lemiere B., Chiron S.**

"Guide méthodologique pour l'analyse des sols pollués", Edition BRGM, France, (2001)

• **Jestin-Hurst C., Sims R.C., Sims J.L., Sorensen D.L., McLean J.E., Huling S.**

"Polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation as a function of oxygen tension in contaminated soil", Journal of Hazardous Materials, N° 51, pp 193-208, (1996)

• **Jones K.C., Stratford J.A., Titridge P., Waterhouse K.S**

"Polynuclear aromatic hydrocarbons in an agricultural soil: long term changes in profile distribution", Environ Pollut, N°56, pp337-351, (1989)

• **Juhasz A.L. et Naïdu R.**

"Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene", International Biodeterioration & Biodegradation, N° 45, pp 57-88, (2000)

• **Kanaly R.A., Harayama S.**

"Biodegradation of high-molecular-weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by bacteria", Journal of Bacteriology, vol 8, N° 182, pp 2059-2067, (2000)

• **Koller E.**

"Traitement des pollutions industrielles. Eau. Air. Déchets. Sols. Boues", Editions Donod, Paris, (2004)

• **Kuony S.**

"Caractérisation d'arène dioxygénases impliquées dans la biodégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques chez *mycobacterium* SP. 6PY1", Thèse de doctorat, Université Joseph Fourier-Grenoble I, (2005)

• **Kwang-Mu Yent Irwin C. Gunsalus**

"Regulation of Naphthalene Catabolic Genes of Plasmid NAH7", Journal of Bacteriology, Vol. 162, N° 3, pp 1008-1013, (1985)

• **Lallemand-Barrés A.**

" Méthodes de dépollution des eaux souterraines", Editions BRGM, (1995)

• **Lecomte P.**

" Les sites pollués : Traitement des sols et des eaux souterraines ", Edition Technique & Documentation, Paris, (1995)

• **Lecoq C., Tassin B., Thevenot D.**

" Transfert des polluants dans les hydrosystèmes", Edition Presse de l'école nationale des ponts et chaussées, Paris, (0000)

• **Lei L., A.P. khodadoust, M.T. Suidan, H.H. Tabak**

"Biodegradation of sediment- bound PAHs in field- contaminated sediment", water research, N° 39, pp 349- 361, (2005)

• **Liste H., Alexander M.**

"Plant-promoted pyrene degradation in soil", Chemosphere, N° 40, pp 7-10, (2000)

• **Loi Canadienne sur la protection de l'environnement LCPE**

" Liste des substances d'intérêt prioritaire, rapport d'évaluation, Hydrocarbures aromatiques polycycliques" N° de catalogue En 40-215/42F Edition, Ministre des approvisionnements et services, Canada, (1994)

• **Menoreb C.**

"Traitement d'effluents concentrés par culture fixée sur gravier ou pouzzolane", thèse de doctorat, Université Montpellier II, (2001)

• **Meyer S. et Steinhart H.**

"Fate of PAHs and hetero-PAHs during biodegradation in a model soil/compost-system : formation of extractable metabolites", Water, Air, and Soil Pollution, N° 132: 215-231, (2001)

• **Mougin C., Chaplain V., Gaillardon P., Pratt M.**

" Remedial processes for contaminated land " Published by Institution for Chemical Engineers London, (1993)

• **Mougin C., Chaplain V., Gaillardon P., Sohier L., Mercier R., Sigoillot J-C., Laugero C., Asther M.**

"Le traitement biologique des sols pollués par des composés organiques, l'intérêt des champignons filamenteux", Le courrier de l'environnement de l'INRA, N° 28, (1996)

• **Mulder H., Breure A.M., Rulkens W.H.**

"Prediction of complete bioremediation periods for PAH soil pollutants in different physical states by mechanistic models", Chemosphere, N° 43, pp 1085-1094, (2001)

• **Murry J.Mc.**

"Chimie organique, les grands principes" Editions Dunod, Paris, (2000)

• **Nano G., Borroni A., Jacomelli A., Rota R.**

"Bioremediation of polluted soil with slurry and solid-phase bioreactors", Chemical Engineering Transactions, vol. 3, pp 853-858, (2003)

• **Namkoony W., Hway E. Y., Park J. S., Choi J. Y.**

"Bioremediation of diesel – contaminated soil with composting", Environnemental pollution, vol 119, N° 1 pp 23–31, (2002)

- **Pansu M., Gautheyrou J., Loyer J.Y.**
"L'Analyse du sol, échantillonnage, instrumentation et contrôle", Editions Masson, Paris, (1998)

- **Perrin- Ganier C., Soulas G., Ciesielski H., Caria G., Budzinski H.**
"Disponibilité de composés traces organiques dans les sols amendés par les boues d'épuration", Dossier de l'environnement de l'INRA, N°25, (2000)

- **Pichard A.**
" INDENO (1,2,3-cd) –Pyrène" INERIS Institut National de l'Environnement industriel et des RISques, (2002)

- **Pichard (responsable du programme) ; C. GILLET (documentation)**
"Fiche de données toxicologique et environnementales des substances chimiques"
"NAPHTALÈNE" ; Version N°3-1-novembre (2004)
"ACÉNAPHTÈNE" ; Version N° 1-2 / février (2004)
"PHÉNANTHRÈNE" ; Version N°2-1/novembre (2003)
INERIS Institut National de l'Environnement industriel et des RISques

- **Potapov V., Tatarintchik S.**
"Chimie organique (traduit du russe par E. Oumanski) ", Editions Mir. Moscou, (1988)

- **Potin O., Rafin C., Veignie E.**
"Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil" International biodeterioration & biodegradation, N° 54, pp 45-52, (2004a)

- **Potin O., Rafin C., Veignie E.**
"Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Cladosporium sphaerospermum* isolated from an aged PAH contaminated soil", FEMS Microbiology Ecology, N° 51, pp 71-78, (2004b)

- **Ratledge C.**
"Biochemistry of microbial degradation", Edition Kluwer Academic Publishers Science, N° 163, pp 229-248, (1994)

- **Richards J.H; Cram D.J; Hammond G.S.**
"Eléments de chimie organique", Edition Mc Graw-Hill, Canada, (1984)

- **Riviere J.**
"Evaluation du risque écologique des sols pollués" Edition Fleurnoir, Paris, (1979)

- **Samanta S.K., Singh O.M., Jain R.K.**
"Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation", Trends in Biotechnology, vol 6, N° 20, pp 243-248, (2002)

- **Saraswathy A., Hallberg R.**
"Degradation of pyrene by indigenous fungi from a former gasworks site", FEMS Microbiology Letters, N° 210, pp227-232, (2002)

- **Scriban R.**
"Biotechnologie" 5^{ème} édition, Edition Tec & Doc, Paris, (1999)

- **Smith M.J., Lethbridge G., Burns R. G.**
"Bioavailability and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils", FEMS Microbiology Letters, N° 152, pp 141-147, (1997)

- **Straube W.L., Nestler C.C., Hansen L.D., Ringleberg D., Ritchard P.H., Jones-Meehan J.**
"Remediation of polycyclic hydrocarbons (PAHs) through Landfarming with Biostimulation and Bioaugmentation", Acta Biotechnol, N° 23 (2-3), pp 179-196 I, (2003)

- **Tardy P.**
"Modélisation de la pollution des sols et des nappes par des hydrocarbures", Thèse de doctorat, spécialité mathématique appliquée, Université de Bordeaux I, (1995)

- **Thiele S., Brümmer G.W.**
"Bioformation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil under oxygen deficient conditions", Soil Biology & Biochemistry, N° 34, pp 733-735, (2001)

- **Valat C.**
"Développement d'outils biologiques pour le diagnostic environnemental", thèse de doctorat, Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Étienne et Université Jean Monnet de Saint-Étienne, (2005)

- **Vandecasteele J-P., Fayolle F., Marchal R., Chauvaux S.**
"Biodégradation des produits pétroliers. Le cas des essences et des éthers-carburants", Bull.Soc.Fr.Microbial., vol 16, N°3, pp 184-189, (2001)

- **Vogel T.M.**
"Bioremédiation des sols", Technique de l'Ingénieur, traité Génie des procédés, vol J3, (2001)

- **Vogel T., Ballerini D.**
"Bioréstauration des sols et des aquifères contaminés par des hydrocarbures et des composés halogénés", Bull. Soc.Fr. Microbial., vol 3, N° 16, (2001)

- **Wauguier J-P.**
"Le raffinage du pétrole, première partie", Editions Technip, Paris, (1994)

• **Yu S.H., Ke L., Wong Y.S., Tam N.F.Y.**

"Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments", *Environment International*, N° 31, pp 149-154, (2005)

• **Westinghouse Savannah River Company WSRC**

"Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon-contaminated Soils", Comprehensive Report Skip Chamberlain, Office of Science and Technology, EM-50 U.S. Department of Energy. Rapport 00975 (U), (2000)

• **Wild S.R., Berrow M.L., McGrath S.P., Jones K.C.**

"Polynuclear aromatic hydrocarbons in crops from long term experiments amended with sewage sludge", *Environ Pollut*, N° 76, pp 25-32, (1992)

• **Wild S.R., Waterhouse K.S., McGrath S.P., Jones K.C.**

"Organic contaminants in an agricultural soil with a known history of sewage sludge amendments: polynuclear aromatic hydrocarbons", *Environ Sci Technol*, N°24, pp 1706-1711, (1990)

ANNEXES

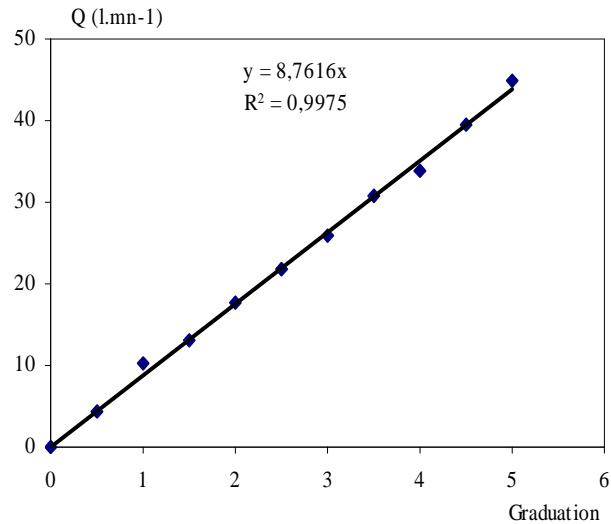
Annexe 1

Etalonnage du débit mètre

Calcul des vitesses de l'air

Etalonnage du débit mètre

Graduation	Q (l/mn ⁻¹)
0	0
0.5	4,38
1	10,33
1.5	13,14
2	17,6
2.5	21,9
3	25,78
3.5	30,67
4	33,78
4.5	39,43
5	44,78



Calcul de la vitesse de l'air

$$U = \frac{Q}{A} = \frac{Q}{\pi \cdot R^2} = \frac{4 \cdot Q}{\pi \cdot D^2} \quad \text{équation A1}$$

Où :

U est la vitesse de l'air injecté dans la colonne (en m.s⁻¹)

Q est le débit volumique de l'air injecté dans la colonne (en L.mn⁻¹)

A est la section droite de la colonne

L'application numérique de l'équation A1 nous donne :

$$U = \frac{4 \cdot Q}{\pi \cdot (62 \cdot 10^{-3})^2} \times \frac{10^{-3}}{60}$$

$$U_{(m.s^{-1})} = 5,52 \cdot 10^{-3} \times Q_{(L.mn^{-1})}$$

$$U_{(cm.s^{-1})} = 0,552 \times Q_{(L.mn^{-1})}$$

Les vitesses de fluidisation adaptées dans notre étude et correspondante à la graduation N° 1,5 et N° 3, sont respectivement : $U_f = 7,6 \text{ cm.s}^{-1}$, $U_f = 11,7 \text{ cm.s}^{-1}$.

La seule vitesse de jet utilisée est celle qui correspond à la graduation N° 1,5, elle est égale à : $U_j = 7,6 \text{ cm.s}^{-1}$

Annexe 2
Distribution granulométrique du solide :
Diamètres des particules



La répartition granulométrique du solide a été obtenue par tamisage. On pèse le solide recueilli sur chacun des tamis (figure A2) et on porte les résultats sous forme de pourcentage pondérale retenu ou pourcentage cumulé.

Figure A2

Le tamisage permet de caractériser l'échantillon par l'un des diamètres suivants :

- Diamètre arithmétique : $d_A = \frac{\sum m_i d_i}{\sum m_i}$ (A2.1)

- Diamètre harmonique : $d_h = \frac{\sum m_i}{\sum \frac{m_i}{d_i}}$ (A2.2)

- Diamètre de surface : $d_s = \sqrt{\frac{\sum m_i d_i^2}{\sum m_i}}$ (A2.3)

- Diamètre de volume : $d_v = \sqrt[3]{\frac{\sum m_i d_i^3}{\sum m_i}}$ (A2.4)

- Diamètre de volume et de surface : $d_{vsm} = \frac{\sum m_i d_i^3}{\sum m_i d_i^2}$ (A2.5)

- Diamètre géométrique : $d_g = 10^{\frac{\sum m_i \log d_i}{\sum m_i}}$ (A2.6)

Avec :

m_i : la masse du solide recueilli dans le tamis (i) en g ;

d_i : diamètre moyen des particules retenues dans le tamis d'ouverture d_{A_i} en μm .

$$d_i = \frac{d_{A_{i-1}} + d_{A_i}}{2} \quad (\text{A2.7})$$

Un tamisage d'un échantillon de 99,93 g est représenté sur le tableau (A2.1):

N° du tamis	d_{A_i} (μm)	d_i (μm)	m_i (g)	% massique retenu	% massique cumulé
1	800				
2	630	715,0	5,84	5,844	5,844
3	500	565,0	20,09	20,104	25,948
4	250	375,0	68,07	68,118	95,066
5	125	187,5	5,71	5,714	100,78
6	63	94,0	0,29	0,290	101,07

m_i (masse retenue) \longrightarrow 99,93

% massique retenue \longrightarrow 100 %

Donc: % massique retenue = $[m_i \text{ (masse retenue)} \times 100 / 99,93]$

Les différents diamètres moyens sont :

$d_A = 424,5 \mu\text{m}$

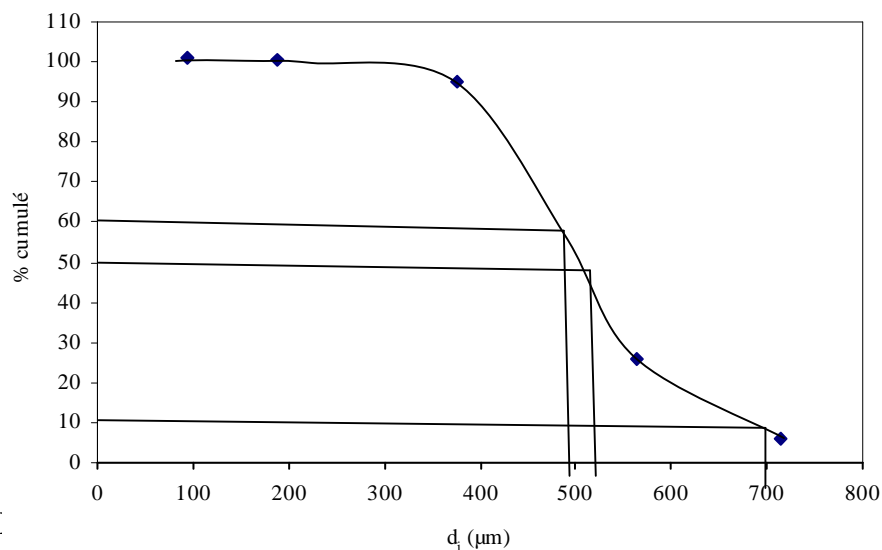
$d_h = 382,5 \mu\text{m}$

$d_s = 437,9 \mu\text{m}$

$d_v = 454,4 \mu\text{m}$

$d_{vsm} = 489,3 \mu\text{m}$

$d_g = 404,8 \mu\text{m}$



Le diamètre de Sauter déterminé à partir de la figure (A2.1), qui correspond à un pourcentage cumulé de 50 %, est égale à 507 μm

$$d_{60} = 480 \mu\text{m}$$

$$d_{10} = 700 \mu\text{m}$$

$$U = d_{60} / d_{10} = 68 \%$$

Annexe 3

Courbe d'étalonnage du phosphore assimilable

Principe

Un sol prétraité conformément à l'ISO 11464 est traité au moyen d'une solution à 0.5 mol.L^{-1} d'hydrogénocarbonate de sodium de pH 8,50, de façon à réduire la concentration en ions Calcium, Aluminium et fer(III) par précipitation de carbonate de calcium et d'hydroxyde d'aluminium et de fer(III) et de façon à libérer les ions phosphates dans la solution.

Une droite d'étalonnage est réalisée (figure A3) grâce à une solution mère de dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4). Les concentrations en phosphore de la gamme étalon varient de 0 à 18 mg.L^{-1} .

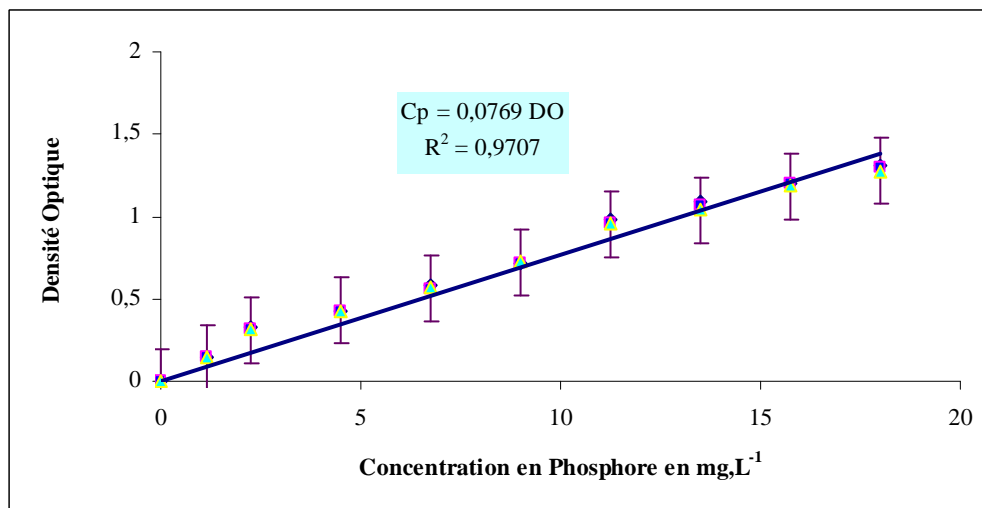


Figure A3 : droite d'étalonnage utilisée pour le dosage du phosphore

C_p : représente la concentration en phosphore en mg.L^{-1}

DO : représente la densité optique ou l'absorbance

Annexe 4

Dosage de l'azote total

La méthode de Kjeldahl modifiée est une méthode de dosage de la teneur totale en azote dans le sol (sous sa forme ammonium, nitrate, nitrite et organique). Elle est fondée sur la minéralisation de type Kjeldahl, mais le catalyseur utilisé est le dioxyde de titane (TiO_2), au lieu du sélénium.

Réactifs

Acide salicylique	1,25 g	Acide salicylique/ Acide sulfurique
Acide sulfurique ($1,84 \text{ g.cm}^3$)	50 ml	
K_2SO_4	10 g	Mélange catalytique au sulfate de potassium
$\text{CuSO}_4, \text{H}_2\text{O}$	0,3 g	
TiO_2	0,3 g	
NaOH	10 mol.L^{-1}	
H_3BO_3	20 g.L^{-1}	
Vert de bromocrésol	0,1 g	Indicateur coloré
Rouge de méthyl	0,02 g	
Ethanol	100 ml	
Acide sulfurique	$0,01 \text{ mol.L}^{-1}$	

Mode opératoire :

- Placer 1 g une prise d'essai d'un échantillon de sol séché à l'air dans le matras de minéralisation
- Ajouter 4 ml d'acide salicylique/sulfurique
- Agiter le matras jusqu'à ce que la solution d'acide soit bien mélangée au sol
- Laisser reposer le mélange au moins quelques heures (ou pendant une nuit)
- Ajouter 0,5 g de thiosulfate de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_7$) à l'aide d'un entonnoir sec
- Chauffer le mélange avec précaution sur le dispositif de minéralisation jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de mousse
- Refroidir le matras
- Ajouter 1,1 g du mélange catalytique
- Chauffer le mélange réactionnel jusqu'à ce qu'il devienne clair (porter à ébullition le mélange pendant un maximum de 5 h)

Lorsque le procédé de minéralisation est terminé,

- laisser refroidir le matras
- ajouter lentement, sous agitation, approximativement 20 ml d'eau
- agiter le matras et transférer son contenu dans l'appareil de distillation
- ajouter 5 ml d'acide borique dans une fiole conique de 100 ml
- placer la fiole en sortie du condensateur, de manière à ce que son extrémité plonge dans la solution
- ajouter 20 ml d'hydroxyde de sodium dans l'entonnoir de l'appareillage et laisser couler la base dans le ballon de distillation
- ajouter quelques gouttes d'indicateur coloré au distillat

- titrer avec de l'acide sulfurique jusqu'à virage au violet.

Expression des résultats

La teneur totale en azote (w_N), en milligrammes par gramme, est calculée selon la formule suivante :

$$w_N = \frac{(V_1 - V_0) \times C(H^+) \times M_N}{m}$$

Où :

V_1 est le volume, en millilitres, d'acide sulfurique utilisé pour le dosage de l'échantillon

V_0 est le volume, en millilitres, d'acide sulfurique utilisé dans l'essai à blanc

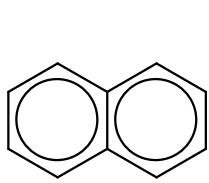
$C(H^+)$ est la concentration en H^+ d'acide sulfurique en moles par litre

M_N est la masse molaire de l'azote, en grammes par mole

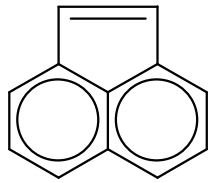
m est la masse, en grammes, de l'échantillon du sol séché à l'air.

Annexe 5

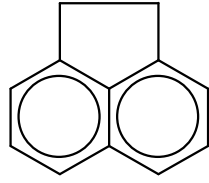
Les seize HAP identifiés comme polluant prioritaire par l'EPA



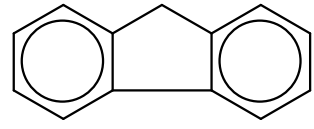
Naphtalène (NAP)



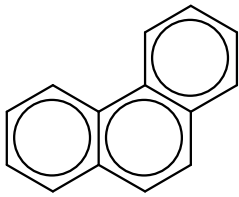
Acénaphtylène (ACY)



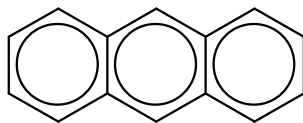
Acénaphtène (ACE)



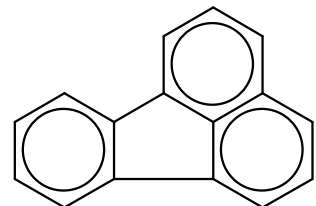
Fluorène (FLU)



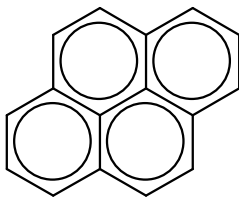
Phénanthrène (PHE)



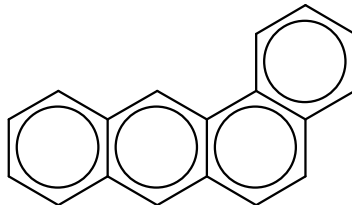
Anthracène (ANT)



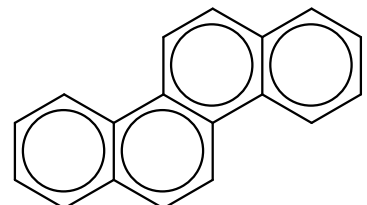
Fluoranthène (FLT)



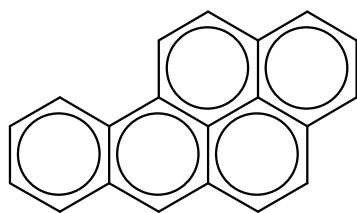
Pyrène (PYR)



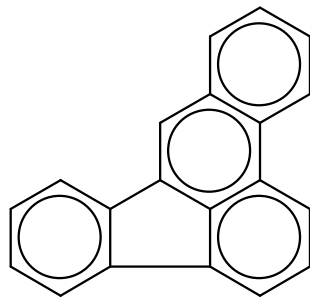
Benzo(a)anthracène (BaANT)



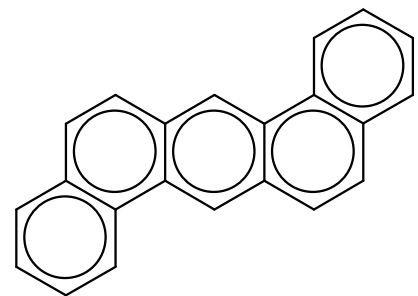
Chrysène (CHY)



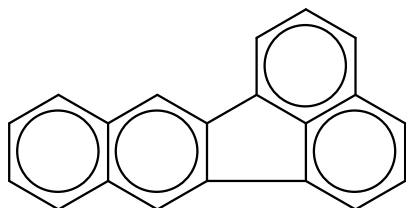
Benzo(a)pyrène (BaPYR)



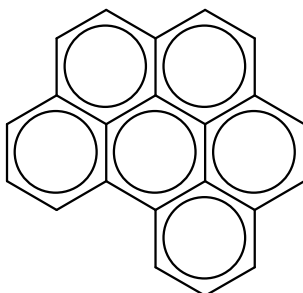
Benzo(b)fluoranthène (BbFLT)



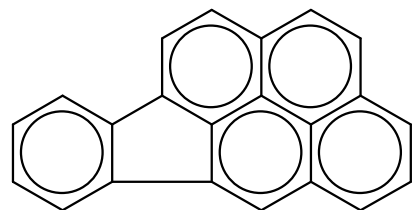
Dibenzo(ah)anthracène (dBahANT)



Benzo(k)fluoranthène (BkFLT)



Benzo(ghi)pérylène (BghiPL)



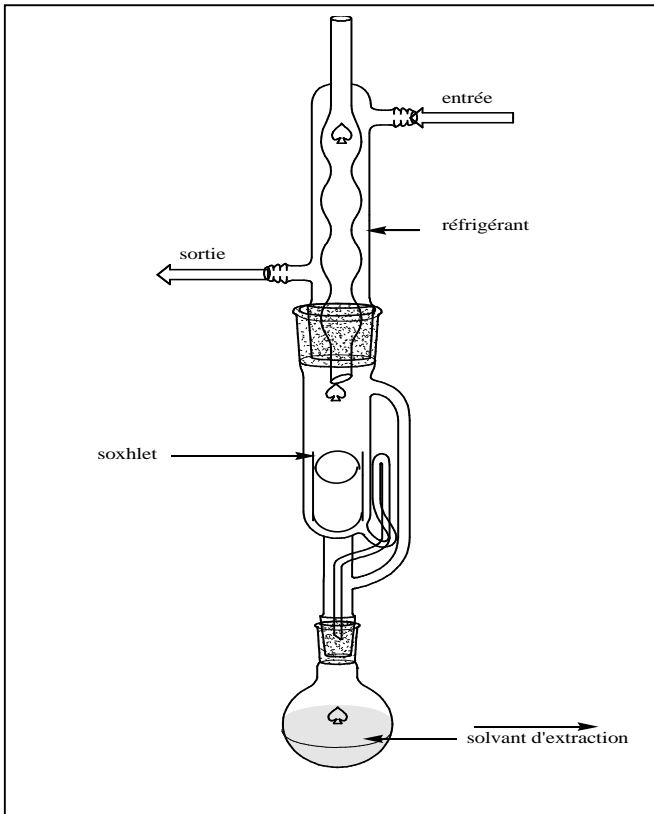
Indeno(1,2,3-cd)pyrène (IcdPYR)

Annexe 6

Extracteur soxhlet et ultrason

Extracteur de soxhlet

Principe:



Le solvant (dichlorométhane) est porté à ébullition, puis condensé avec le réfrigérant, dans le réservoir à siphon, contenant le solide à extraire dans une cartouche en cellulose. Le contact entre le solvant et le produit à extraire dure pendant l'accumulation de solvant dans le réservoir, puis quand le solvant atteint un certain niveau, il amorce le siphon et retourne dans le ballon en entraînant la substance dissoute. Ce cycle se répète trente deux fois, soit une durée d'extraction de cinq heures.

Figure A6.1 : Extracteur de soxhlet



Figure A6.2 : Extracteur d'ultrason

Annexe 7 :**Droites d'étalonnage des HAP étudiés**

L'étalonnage du système HPLC est réalisé conformément à la norme internationale, en préparant et en mesurant au moins trois dilutions de la solution mère. La courbe d'étalonnage doit être linéaire.

Les droites d'étalonnage (figure A7.1), pour des concentrations en étalon variant de 0 à 1000 mg .L⁻¹, sont obtenues et réalisées pour chaque HAP. Les coefficients des droites de régression sont supérieurs à 0.99 pour chacun des produits.

Les équations de la surface en fonction de la concentration permettent ensuite d'obtenir les concentrations inconnues des échantillons.

Les longueurs d'onde optimales des trois HAP ainsi que leurs temps de rétention sont illustrés dans le tableau suivant :

Tableau A7 : Temps de rétention et longueurs d'onde optimales des trois HAP étudiés

HAP	Temps de rétention TR (min)	Longueur d'onde (nm)
Naphtalène	3,918	220
Acénaphène	6,501	227
Phénanthrène	7,513	250

Un chromatogramme des solutions étalons des HAP est présenté par la figure A7.2.

Un chromatogramme des extraits est présenté par la figure A7.3.

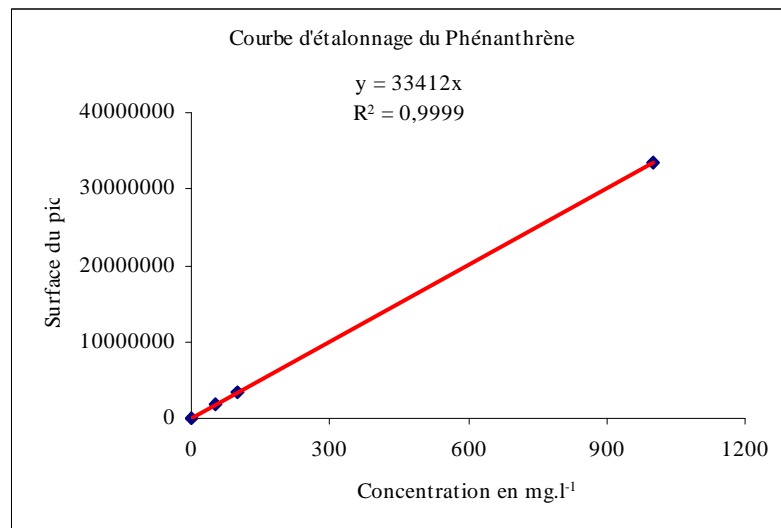
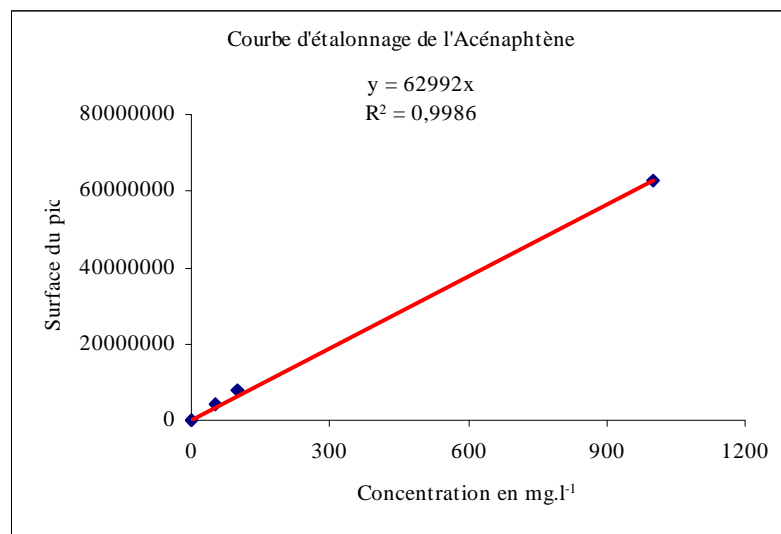
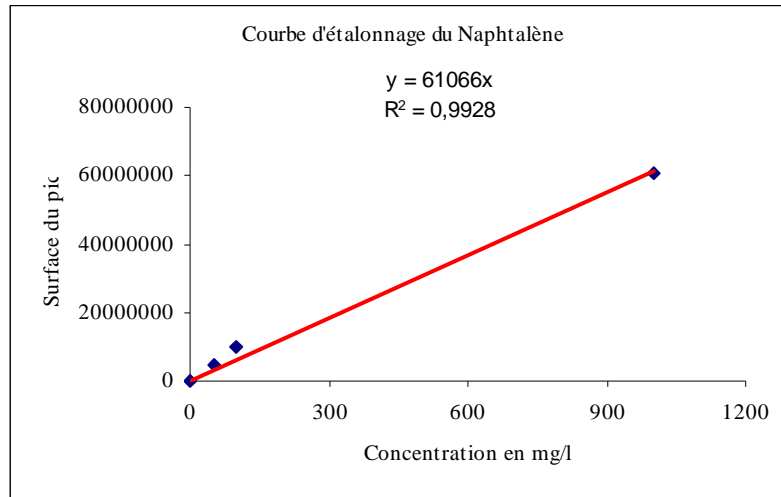


Figure A7.1 : droites d'étalonnage des HAP étudiés

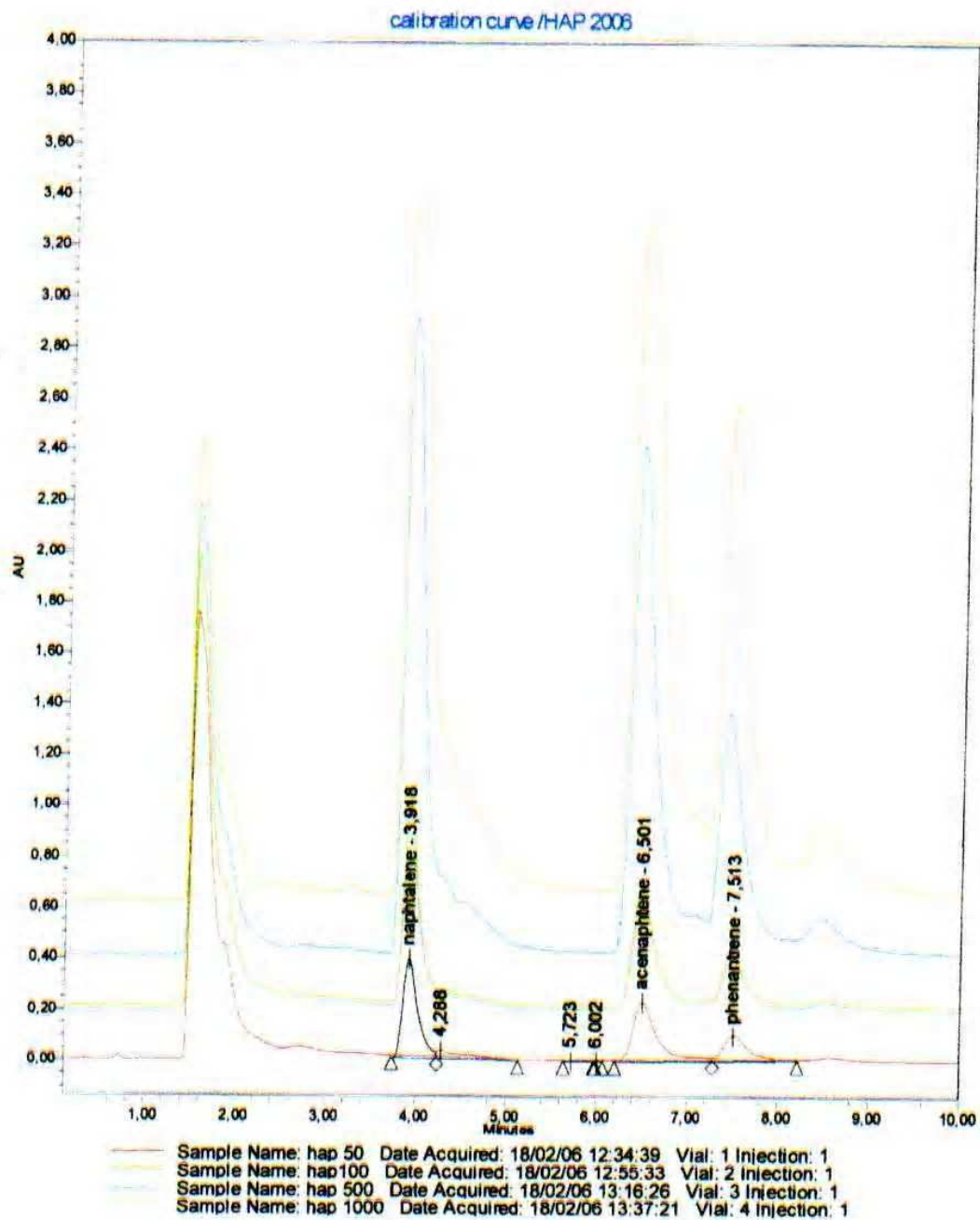


Figure A7.2 : chromatogramme des étalons

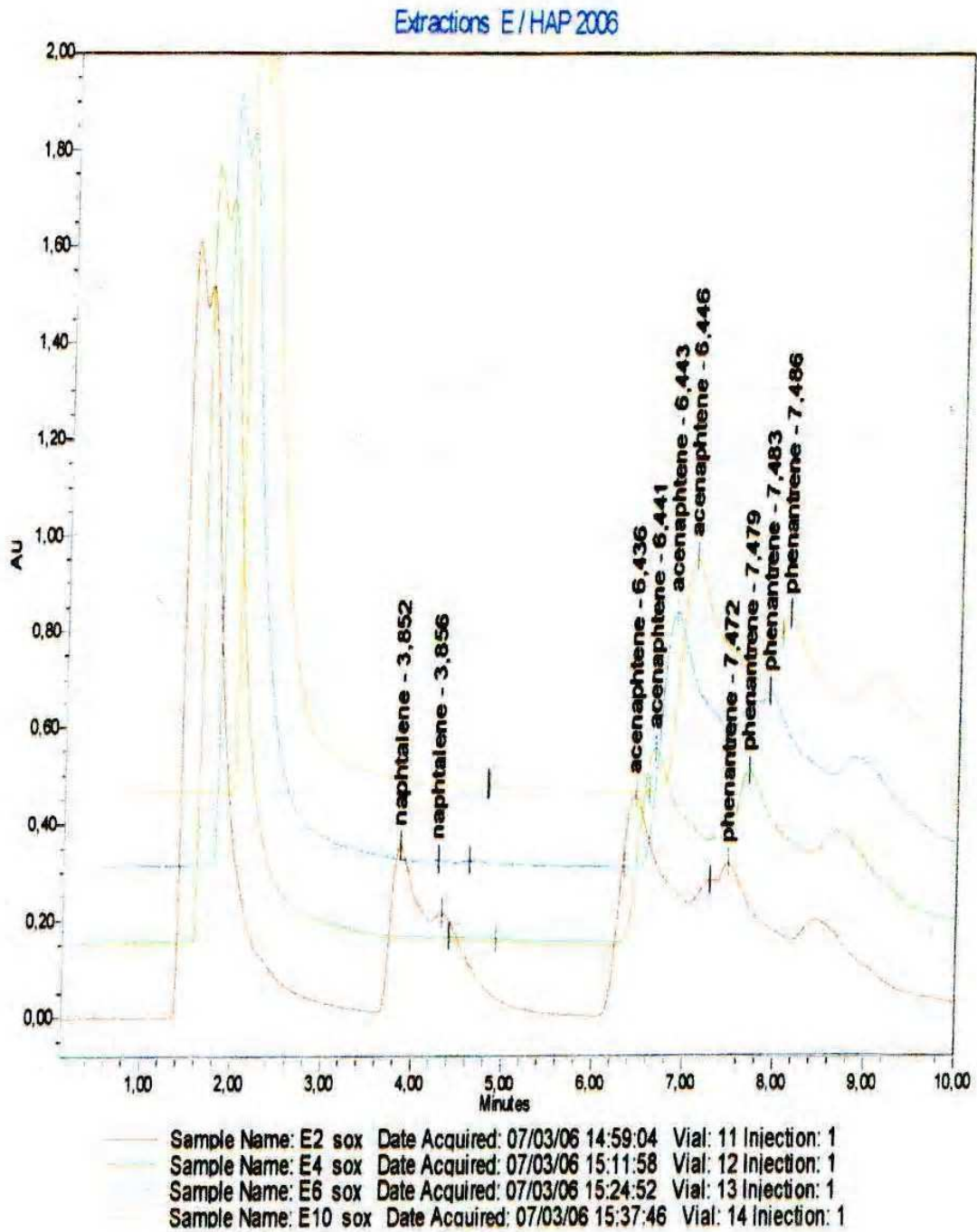


Figure A7.3 : chromatogramme d'un échantillon

Annexe 8 Détermination des vitesses minimales (de fluidisation et de jet)

Calcul de la vitesse minimale de fluidisation

L'équation suivante permet d'obtenir la vitesse minimale de fluidisation en fonction des caractéristiques du sol et du gaz ainsi que l'accélération de la pesanteur.

$$U_{mf} = \frac{((\psi \cdot d_p)^2 [(\rho_p - \rho_g)g / \mu_g] \varepsilon_{mf}^3)}{150(1 - \varepsilon_{mf})}$$

d_p : diamètre moyen des particules ; $d_p = 577,18 \cdot 10^{-6}$ m

ρ_g : masse volumique du fluide ; $\rho_g = 1,2$ kg.m⁻³

ρ_p : masse volumique des particules du sol ; $\rho_p = 2604$ kg.m⁻³

μ_g : viscosité du fluide ; $\mu_g = 1,8 \cdot 10^{-5}$

g : accélération de la pesanteur ; $g = 9,81$ m.s⁻²

ψ : coefficient de sphéricité ; $\psi = 0,86$

ε_{mf} : porosité du lit fixe ; $\varepsilon_{mf} = 0,4$

$$U_{mf} = \frac{((0,86 \cdot 577,18 \cdot 10^{-6})^2 [(2604 - 1,2) \cdot 9,81 / 1,8 \cdot 10^{-5}] 0,4^3)}{150(1 - 0,4)}$$

$$U_{mf} = 9,46 \text{ cm.s}^{-1}$$

Calcul de la vitesse minimale de jet

$$U_{mj} = \left(\frac{d_p}{D_c} \right) \left(\frac{d_0}{D_c} \right)^{\frac{1}{3}} \left[\frac{2gH(\rho_p - \rho_g)}{\rho_g} \right]^{0,5}$$

d_p : diamètre des particules ; $d_p = 391$ μm

d_0 : diamètre de l'injecteur ; $d_0 = 5$ mm

D_c : diamètre de la colonne ; $D_c = 62$ mm

H : hauteur du lit ; $H = 140$ mm

$$U_{mj} = 19,20 \text{ cm.s}^{-1}$$

ملخص

يحتل حاليا موضوع حماية البيئة، مشكلة في غاية الأهمية تكمن في تلوث المواقع الصناعية، بملوثات هيدروكربونية (HAP) و إعادة تهيئتها ، خاصة بالأثر الذي تحدثه على مستوى مصادر المياه الصالحة للشرب.

هذا ما دفعنا بشدة إلى اختيار دراسة المعالجة البيولوجية لتربة الملوثة داخل مفاعل بيولوجي مذبذب تحت التدفق، في شروط مناسبة تخضع للرقابة .

عملنا يتطلب قياس قابلية الانحلال البيولوجي للهيدروكربونات الموجودة في التربة بنسبة 40 غ. كغ⁻¹ و هذا باستعمال الطريقة الكروماتوغرافية (HPLC) و التنفس الخلوي أو البكتيري (respirométrie).

إستئصال هذه الملوثات من التربة المعالجة تم إجرائه بواسطة soxhlet الذي يعد عملية فعالة و ناجعة .

كان من المهم إيجاد نسبة تبخر الهيدروكربونات (HAP) و ذلك لتقييم مساهمة البكتيريا في القضاء على هذه الملوثات.

كلمات مفاتيح: المعالجة البيولوجية ، مفاعل بيولوجي تحت التدفق، التبخر ، التنفس البكتيري .

Résumé

Un problème important est actuellement posé au sujet de la protection de l'environnement, celui des sites industriels pollués par les HAP et de leur réhabilitation notamment au niveau de leur impact sur les aquifères et la ressource en eau.

A cet effet, nous avons choisi d'étudier le traitement biologique d'un sol contaminé par les HAP dans un bioréacteur fluidisé à jet sous des conditions optimales contrôlées.

Notre travail consiste à mesurer, par HPLC et par respirométrie, la biodégradabilité de ces xénobiotiques présent dans le sol avec un taux de contamination de 40 g.kg⁻¹. L'extraction de ces polluants a été effectuée par soxhlet qui est une méthode efficace et performante.

La détermination du taux d'évaporation des hydrocarbures aromatiques polycycliques étudiés s'est avérée nécessaire afin d'évaluer la contribution de la flore microbienne dans l'élimination de ces polluants.

Mots clés : Biodégradation, HAP, bioréacteur, lit fluidisé, évaporation, respirométrie, soxhlet.

Abstract:

A significant problem is currently posed about environment protection, it concerns industrial polluted sites by PAHs (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) and their rehabilitation, particularly their impact on the aquifers and the water resource.

By the way, we have selected to study biological treatment of contaminated soil by PAHs, inside a fluidized bed bioreactor under controlled optimal conditions.

Our work consists on measuring, by means of HPLC and respirometry apparatus, the biodegradability of these xenobiotics present in soil with 40 g.kg⁻¹ contamination level. The extraction of these pollutants was carried out using soxhlet which is a very efficient method.

The determination of evaporation level of the studied Polycyclic Aromatic Hydrocarbons used to be necessary to evaluate the contribution of microbial flora to eliminate these pollutants.

Keywords: Biodegradation, PAH, bioreactor, fluidized bed, evaporation, respirometry, soxhlet